



# TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA EM EQUINOS

TIAGO PESSANHA GUIMARÃES

Tese de Doutoramento em Ciências Veterinárias

2014

Tiago Pessanha Guimarães

## **TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA EM EQUINOS**

Tese de Candidatura ao grau de Doutor em Ciências Veterinárias, submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Professor Doutor António Rocha

Categoria – Professor Catedrático

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Coorientador – Professora Doutora Maria da Graça Lopes

Categoria – Professora Auxiliar

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

*"Before enlightenment: chop wood carry water. After enlightenment: chop wood carry water."* Provérbio Zen

Os resultados dos trabalhos experimentais incluídos na presente Tese fazem parte dos seguintes artigos científicos:

**Guimarães T**, Miranda C, Pinto M, Silva E, Damásio L, Costa AL, Correia MJ, Duarte JC, Cosinha C, Lopes G, Thompson G, Rocha A. 2014. Effect of breeding activity on the microflora of the external genitalia and in the semen of stallions, and the relationship between microorganisms on the skin and on the external genitalia (submetido).

**Guimarães T**, Lopes G, Miranda C, Pinto M, Silva E, Correia MJ, Thompson G, Rocha A. Colloid centrifugation of fresh stallion semen prior to cryopreservation decreased microorganism load of froze-thawed semen without affecting seminal kinetics ( por submeter)

**Guimarães T**, Carvalheira C, Rocha A. 2011. Conception rate, uterine infection and embryo quality after artificial insemination and natural breeding with a stallion carrier of *Pseudomonas aeruginosa*: a case report. *Acta Veterinaria Scandinavica* 54: 20-25.

**Guimarães T**, Lopes G , Ferreira P, Leal I, Rocha A. 2012. Characteristics of stallion epididymal spermatozoa at collection and effect of two refrigeration protocols on the quality of the frozen/thawed sperm cells. *Animal Reproduction Science*, **136**: 85-89)

## **Agradecimentos**

A elaboração deste trabalho teve o apoio de várias instituições e pessoas a quem desejo agradecer. Este trabalho foi realizado nos laboratórios do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS) da Universidade do Porto, no laboratório de reprodução equina da Fundação Alter Real, e foi financiado pelo projecto europeu FCOMP-01-0124-FEDER-009562/FCT TDC/CVT/108456/2008.

Ao orientador Professor Doutor António Rocha, quero agradecer a oportunidade única concedida na realização deste programa doutoral sob a sua orientação. A sua supervisão e orientação foram imprescindíveis para que este trabalho acontecesse. A sua abertura mental, capacidade de análise, espírito crítico e exigência, moldaram a minha forma de trabalhar e de investigar.

À Professora Doutora Maria da Graça Lopes quero agradecer o perfeccionismo e minúcia que me exigiu em todos os passos desta tese. A sua paciência e acutilância crítica perante as minhas capacidades de escrita científica, obrigaram-me a percorrer um longo e penoso caminho. Obrigado.

A todos os alunos estagiários (Júlio Domingues, Ana Moreira, Liliane Damásio e Raquel Cunha), actualmente Médicos Veterinários encartados, que passaram pelo Centro de Reprodução Animal de Vairão quero agradecer pela disposição e ajuda incansável prestada no trabalho clínico e experimental.

Aos colegas, Dra. Inês Reis, Dr. Augusto Fernandes, Dra. Ana Costa, Dra. Maria José Correia, Dr. José Carlos Duarte e Dra. Cristina Cosinha, pela contribuição desinteressada na obtenção de amostras nestes 4 anos de trabalho.

À Professora Doutora Gertrude Thompson e sua equipa do Laboratório de Doenças Infecciosas do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar pela contribuição dada na área da Microbiologia.

Ao Engenheiro Paulo Ferreira pela ajuda prestada na elaboração de meios e diluidores de sémen.

Às mulheres da minha vida queria agradecer:

À Patrícia pela força transmitida e pela capacidade aguentar 4 Primaveras/Verões sem férias, fim de semanas ou feriados... Sem se queixar excessivamente. Adoro-te!

À “Senhora Dona Mãe” e “Senhora Dona Avó” pelo amor incondicional, valiosa genética e valores transmitidos que fizeram de mim o que sou hoje.

À Filipa e à *taliban* Rita por fazerem parte da minha vida.

Ao meu Pai, sem ele não estaria cá, pelos bons momentos e pelo exemplo dado.

**C** - graus Celsius

**CASA** - Análise de Sêmen Assistida por Computador

**CFU** - unidades formadoras de colônias

**cm** - centímetro

**CPA** - agente crioprotector

**CRAV** - Centro de Reprodução Animal de Vairão

**DEF** - percentagem de espermatozoides com anomalias

**DGC** - centrifugação em gradiente de densidade

**DNA** - ácido desoxirribonucleico

**EG** - genitália externa

**g** - força g

**ga** - gauge

**gr** - grama

**GIFT** - transferência intra-falopiana de gametas

**h** - horas

**hCG** - gonadotrofina coriônica humana

**IA** - Inseminação artificial

**ICSI** - injeção intra-citoplasmática

**ICBAS** - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

**i.v.** - intravenoso

**kg** - quilograma

**Lts** - Litros

**mg** - miligrama

**MHz** - mega-hertz

**min** - minuto

**mL** - mililitro

**ML** - carga microbiana

**mm** - milímetro

**MN** - monta natural

**OIE** - World Organization for Animal Health/Organização Mundial de Saúde Animal

**PBS** - solução fosfato tamponizada

**PMO** - motilidade progressiva

**RAP** - percentagem de espermatozoides rápidos

**s** - segundo

**SEM** - erro padrão da média

**SLC** - centrifugação em monocamada

**SPZ** - espermatozóides

**TE** - transferência Embrionária

**TM** - motilidade total

**TRA** - técnica de reprodução assistida

**VAP** - velocidade média

**VSL** - velocidade curvilínea

**µg** - microgramas

**µm** - micrometro



## **ÍNDICE**

Resumo	2
Abstract	5
<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>8</b>
Objectivos	31
Referências Bibliográficas	32
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>40</b>
Effect of breeding activity on the microflora of the external genitalia and in the semen of stallions, and the relationship between microorganisms on the skin and on the external genitalia	
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>59</b>
Colloid centrifugation of fresh stallion semen prior to cryopreservation decreased microorganism load of frozen-thawed semen without affecting seminal kinetics	
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>75</b>
Conception rate, uterine infection and embryo quality after artificial insemination and natural breeding with a stallion carrier of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : a case report	
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>85</b>
Characteristics of stallion epididymal spermatozoa at collection, and effect of two refrigeration protocols on the quality of the frozen/thawed sperm cells.	
<b>DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>100</b>
Referências Bibliográficas	119

<b>ANEXO I.....</b>	<b>125</b>
Effect of Androcoll-E treatment on the frozen/thawed characteristics of equine semen.	
<b>ANEXO II.....</b>	<b>127</b>
Effect of two different refrigeration processes on the quality of chilled and frozen/thawed epididymal spermatozoa.	
<b>ANEXO III.....</b>	<b>130</b>
Are there bacteria in the epididymis of healthy stallions?	
<b>ANEXO IV.....</b>	<b>132</b>
First report of a pregnancy in a mare after the transfer of an embryo produced by artificial insemination with epididymal sperm.	

## **Resumo - Abstract**

Os estudos feitos ao longo desta tese foram direccionados para resolverem algumas das questões levantadas pela aplicação de técnicas de reprodução assistida (TRA) em equinos no Centro de Reprodução Animal de Vairão (CRAV).

No Capítulo 1, estabelecemos o perfil da microflora comensal normal presente na genitália externa dos garanhões na área geográfica estudada. Esta é composta maioritariamente por leveduras e bactérias não patogénicas (*Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* coagulase-negativo, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus* spp. e *Acinetobacter* spp.). Foram também encontradas, em baixa frequência de isolamento, bactérias potencialmente patogénicas ou com efeitos deletérios sobre os parâmetros cinéticos dos espermatozóides durante a refrigeração (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus equi zooepidemicus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Streptococcus dysgalactiae equisimilis*). Adicionalmente, foi determinado pela primeira vez o efeito da actividade reprodutora na microflora presente na genitália externa. Verificamos que o número de espécies isoladas é inferior nos garanhões não reprodutores (15 vs 27) e que as bactérias potencialmente patogénicas (com excepção de *E. coli*) apenas se encontram em garanhões reprodutores. Ainda no Capítulo 1, constatamos a importância da aplicação de medidas sanitárias durante a recolha e processamento de sémen, já que se isolaram microorganismos no sémen que não estavam presentes na genitália externa do garanhão, sugerindo contaminação pelo operador/ambiente.

Foram aqui comparados pela primeira vez os microorganismos da genitália externa com os da pele do abdómen que contacta com o pénis erecto, e com os da microorganismos da pele que não tem contacto directo com o pénis. Muitas espécies de microorganismos são comuns às três áreas pesquisadas (leveduras, bactérias não patogénicas e *E. coli*), mas mais importante foi o facto de não isolarmos as bactérias potencialmente patogénicas, *Staph. aureus*, *K. pneumoniae* e *Ps. aeruginosa* na pele de garanhões portadores destas bactérias na genitália externa. Do ponto de vista prático isto indica não ser necessário lavar o abdómen quando se executam lavagens ou tratamentos tópicos da genitália externa de garanhões portadores das referidas bactérias.

No Capítulo 2, testamos o método de selecção espermática por centrifugação em monocamada com um gel de sílica (Androcoll-E) como um “filtro” de bactérias no sémen, antes da sua criopreservação. Observamos que o sémen descongelado tratado tinha menos 43% da carga total microbiana ( $p < 0.05$ ) que o grupo congelado sem tratamento. No entanto, após sub-divisão do sémen criopreservado em dois grupos – com menos de 30% de motilidade total pós-descongelação e com mais de 30% de motilidade total pós-descongelação, observamos que o efeito “filtrador” do protocolo de selecção espermática desaparecia ( $p > 0.05$ ) para o grupo com menos de 30% de motilidade total. Isto sugere uma associação entre carga de microorganismos e a capacidade da centrifugação em monocamada em remover microorganismos, quando os ejaculados possuem grandes percentagens de células espermáticas mortas ou danificadas. Não se verificou qualquer correlação entre a carga microbiana e os parâmetros de cinética espermática avaliada (motilidade total, velocidade curvilínea, velocidade média, percentagem de espermatozóides rápidos e índice de linearidade) após descongelação do sémen. Não houve também nenhuma melhoria significativa ( $p > 0.05$ ) dos parâmetros cinéticos espermáticos pós-descongelação das amostras submetidas ao tratamento com Androcoll-E, excluindo o índice de linearidade ( $p < 0.05$ ).

No Capítulo 3, um garanhão portador de *Ps. aeruginosa* na genitália externa foi utilizado para monta natural (grupo MN) e recolha de sémen para inseminação artificial (grupo IA). As taxas de gestação por ciclo não diferiram entre ambas as técnicas de reprodução, mas a incidência de patologia uterina foi superior a 50% nas éguas do grupo MN e de apenas 22% no grupo IA. Adicionalmente, 50% das éguas ficaram positivas a *Ps. aeruginosa* após MN, enquanto que não se verificou transmissão venérea por IA. A taxa de recolha de blastocistos obtida em ambos os grupos foi idêntica (66.7%), mas apenas 33.3% dos embriões obtidos no grupo MN foram de grau 1, *versus* 100% no grupo IA. Os resultados obtidos levam-nos a concluir que os garanhões portadores de *Ps. aeruginosa* deverão ser reproduzidos por IA em detrimento da MN, de forma a diminuir os custos veterinários, reduzir a transmissão venérea e possivelmente melhorar a qualidade dos embriões.

No último capítulo trabalhamos na recolha e criopreservação dos espermatozóides da cauda do epidídimo, técnica útil em casos de morte súbita ou

castração de emergência do garanhão. Testamos dois protocolos de refrigeração (4°C durante 24 horas) de espermatozóides da cauda do epidídimo, antes da criopreservação: a refrigeração *in situ* dentro do epidídimo *versus* refrigeração dos espermatozóides epididimários em diluidor de sémen. Todos os parâmetros avaliados após a descongelação do sémen (motilidade total, velocidade linear média, percentagem de espermatozóides rápidos, viabilidade e percentagem de espermatozóides com anomalias) foram similares ( $p>0.05$ ) para os dois tratamentos de refrigeração. Concluímos assim, que a colheita imediata e refrigeração dos espermatozóides da cauda do epidídimo ou a refrigeração dos complexos testículo-epidídimo são igualmente eficientes como meio de preservação dos espermatozóides epididimários, antes da criopreservação.

Em conclusão, o trabalho experimental desenvolvido nesta tese contribuiu para definir a microflora da genitália e do sémen de garanhões em Portugal e estabelecer a prevalência das principais espécies incluindo as potencialmente patogénicas ou com efeitos deletérios para a qualidade do sémen. Determinou-se ainda a relação entre as bactérias da pele e da genitália externa, que permitiu concluir não ser necessário lavar o abdómen quando se executam lavagens/tratamentos tópicos da genitália externa de garanhões portadores de microorganismos potencialmente patogénicos. Foram demonstradas algumas vantagens e limitações da utilização da centrifugação do sémen em monocamada de sílica (Androcoll-E) para melhorar a criopreservação de sémen de garanhão e diminuir a contaminação microbiana dos ejaculados. Confirmou-se ainda o potencial patogénico da *Pseudomonas aeruginosa* como bactéria de transmissão venérea, testaram-se métodos para a utilização segura de garanhões portadores desta bactéria e sugere-se um possível efeito da *P. aeruginosa* na qualidade dos embriões produzidos. Por fim, optimizaram-se técnicas de recolha e preservação de reservas extra-gonadais de espermatozóides, de forma a responder às solicitações da indústria de reprodução de equinos. Globalmente, os resultados obtidos ao longo deste doutoramento propiciaram o melhoramento das taxas de sucesso da aplicação de técnicas de reprodução assistida em equinos e permitiram diversificar os serviços prestados pelo CRAV.

The studies described in this dissertation were developed to find answers to some of the problems encountered during the application of assisted reproduction techniques (TRA) in our equine clinical practice at the Animal Reproduction Center of Vairão (CRAV).

In Chapter 1, we defined the commensal microflora of the external genitalia of stallions in a vast geographical area. This microbial population was constituted mostly by yeasts and non-pathogenic bacteria (*Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* coagulase-negative, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus* spp. and *Acinetobacter* spp.). Pathogenic bacteria and bacteria with deleterious effects on chilled semen (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus equi zooepidemicus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Streptococcus dysgalactiae equisimilis*) were also found, albeit in a low frequency.

The effect of breeding activities in the composition of the external genitalia's microflora was here studied for the first time. The number of microorganisms isolated was lower in non-breeder stallions (15 vs 27) and potentially pathogenic bacteria, with the sole exception for *E. coli*, were only found in breeder stallions. The need for reinforcement of sanitary procedures during semen collection and processing was evidenced by the isolation of microorganisms in semen that were not isolated from the external genitalia, which suggests contamination by the operator.

The microorganism population colonizing the external genitalia was here compared, by the first time, with the microorganisms of the ventral abdominal skin that contacts the erect penis and microorganisms of the skin covering the ribcage area (with no direct contact with the penis). Several microorganism species were common to the three sampled areas (yeasts, non-pathogenic bacteria and *E. coli*). However, potentially pathogenic *Staph. aureus*, *K. pneumoniae* and *Ps. aeruginosa*, were not found in the skin, even in stallions harbouring those bacteria in the external genitalia. A practical implication of this finding is that there seems to be no need to disinfect the abdominal skin of stallions undergoing topical treatment/washing of the external genitalia to eliminate the referred microorganisms.

In the second chapter, we describe the use of a single layer centrifugation sperm selection technique (Androcoll-E) as a bacterial "filter" for fresh semen, before cryopreservation. Semen subjected to the Androcoll-E treatment had less 43% of

total microbial charge ( $p < 0.05$ ) that the non-treated semen, after thawing. However, sub-dividing the frozen/thawed semen in two groups – higher than 30% total motility and lower than 30% total motility, we observed that the “filtration” effect did not occur ( $p > 0.05$ ) for semen with less than 30% total motility. This suggests that, in samples with higher percentages of dead or damaged sperm cells, there is an interaction between bacterial load and the capability of SLC to remove bacteria. No correlation was found between total microbial content and frozen/thawed sperm kinetics (total motility, curvilinear velocity, average path velocity, percentage of rapid sperm cells and straightness index) and no improvement ( $p > 0.05$ ) in seminal characteristics of frozen/thawed semen was seen for samples processed with Androcoll-E, excluding the straightness index parameter ( $p < 0.05$ ).

In Chapter 3, an experiment with a *Ps. aeruginosa* carrier stallion used for natural cover (MN) and artificial insemination (IA) was described. Pregnancy rates per cycle were similar using MN and AI, but more than 50% of MN resulted in severe uterine pathology against only 22% of mild endometritis after AI. Additionally, 50% of the mares became positive to *Ps. aeruginosa* after natural cover, while no venereal transmission was observed after artificial insemination. Blastocyst recovery rate was the same (66.7%) for both groups, but only 33.3% grade 1 embryos were recovered after MN compared to 100% grade 1 embryos obtained after artificial insemination. These results indicate that *Ps. aeruginosa* carrier stallions should be used only through AI to decrease uterine pathology and associated costs, to avoid venereal transmission of the bacteria and possibly, to produce embryos with higher quality.

Finally, in the last chapter we worked in the recovery and cryopreservation of spermatozoa of the epididymal tail, the only available technique to preserve sperm cells in case of stallion's sudden death or emergency castration. Biologic material sent for cryopreservation of epididymal sperm cells has to be shipped refrigerated. Two refrigeration protocols (4°C for 24 hours) were tested: refrigeration of the epididymal tail *versus* refrigeration of extended epididymal spermatozoa. All tested frozen/thawed sperm cell parameters (total motility, linear velocity, percentage of rapid sperm cells, viability and percentage of spermatozoa with anomalies) were similar ( $p > 0.05$ ) between refrigeration treatments. We thus concluded that refrigeration of extended epididymal spermatozoa (small volume



and weight), or the refrigeration of the larger and heavier testis-epididymis complex are both adequate methods to send epididymal sperm cells to semen cryopreservation laboratories.

In conclusion, the experiments carried out for this dissertation contributed to define the microbial population of the genitalia and semen of stallions in Portugal and established the prevalence of the various species including those with pathogenic potential. The relationship between microbial population of the genitalia and of the skin of stallions was determined, and its implications discussed. The advantages and limitations of single-layer centrifugation technique with Androcoll-E to improve the quality of semen, as well as its use as semen's microorganism filter, were determined. The pathogenic potential of *Ps. aeruginosa* as venereally transmitted bacteria was confirmed, methods to avoid its transmission were tested, and a possible deleterious effect of the bacteria on the quality of the embryos produced was suggested. Additionally, methods to collect, condition and preserve extra-gonadal sperm reserves were perfected to answer demands from the equine reproduction industry. All in all, the results achieved contributed to a more efficient use of the assisted reproduction techniques utilized in CRAV and allowed the diversification of the services offered by that center.

# **Introdução Geral**

### **Contextualização Histórica**

Nos últimos 500 anos o progresso humano esteve intimamente ligado ao uso e exploração da força do cavalo. A primeira relação com o cavalo, a de predação, está ilustrada em várias pinturas rupestres por todo o mundo. A sua domesticação, acredita-se que terá ocorrido a cerca de 5000-6000 anos por povos nómadas da Eurásia (Warmuth *et al.*, 2012). Os cavalos eram fonte de carne, leite e matéria-prima para roupa. A sua domesticação e uso como transporte conferiram grandes vantagens adaptativas aos povos nómadas na procura de boas pastagens, locais de caça e principalmente no desenvolvimento da arte da guerra. Durante cerca de 4000 anos a sua aptidão primária era a guerra. No século XI, com o desenvolvimento dos instrumentos agrícolas, os cavalos adquiriram outra dimensão em tempos de paz contribuindo para a optimização da agricultura e do transporte. Actualmente o cavalo é maioritariamente usado para fins recreativos e de lazer, mas o seu impacto económico é ainda evidente em áreas rurais e em funções públicas nas forças de segurança (Department of Economics Swedish University of Agricultural Sciences, 2001).

De acordo com a European Horse Network (<http://www.europeanhorsenetwork.eu/>), actualmente o impacto económico total do “mundo do cavalo” na Europa poderá ser de mais de 100 biliões de euros ano (6 milhões ou mais cavalos; 400 000 empregos a tempo inteiro; 5% de aumento anual de cavaleiros).

### **Técnicas de reprodução assistida**

Actualmente, estão disponíveis e são aplicadas uma extensa variedade de técnicas de reprodução assistida em equinos, tais como recolha de sémen, inseminação artificial (IA), IA histeroscópica com baixas doses de espermatozóides, sexagem de sémen, selecção espermática, transferência de embriões (TE), criopreservação de embriões, colheita e transferência de oócitos, injeção intracitoplasmática (ICSI), transferência de gâmetas (GIFT) e transferência nuclear (Allen, 2005). Nesta introdução foi dado maior ênfase às técnicas de reprodução assistidas aplicadas no desenvolvimento do presente trabalho.

## **Recolha de sémen e/ou de espermatozóides**

Na base de muitas das técnicas de reprodução assistida está a recolha de sémen no garanhão. As primeiras tentativas de recolha de sémen terão sido feitas recorrendo a esponjas intravaginais colocadas na vagina antes da monta natural (Allen, 2005; Bowen, 1969). Apesar da ausência de relatos históricos, a qualidade e quantidade de sémen obtido deveria ser pobre. Em 1934 Roemmele e Milovanov descrevem a utilização de um preservativo de borracha inserido na vagina da égua (Love, 1992). Esta técnica rudimentar resultava frequentemente na perda do ejaculado por má colocação do preservativo e quando bem sucedida os índices de contaminação eram altíssimos devido ao contacto íntimo do sémen com o pénis invariavelmente sujo (Love, 1992). Ambas as técnicas caíram em desuso devido às suas óbvias limitações.

Actualmente, a selecção de garanhões como reprodutores não é feita com base na fertilidade potencial do animal ou resistência a criopreservação, mas sim devido a outros factores. Por exemplo, em cavalos de desporto o principal critério na escolha de garanhões reprodutores é a sua “performance” desportiva (Colenbrander *et al.*, 2003). Assim, a utilização destes animais para a reprodução é apenas feita no fim da carreira desportiva. Nesta altura, muitos garanhões já apresentam problemas músculo-esqueléticos e como tal têm dificuldades em montar éguas/manequim pelo que é de interesse ter várias alternativas para a recolha de sémen. Assim, podemos utilizar, com diferentes graus de eficiência, três tipos de recolha de sémen/espermatozóides: por vagina artificial (VA); por ejaculação química; e por recolha das reservas espermáticas extra-gonadais. A electroejaculação é uma técnica muito eficiente em bovinos e ovinos, mas tem uma aplicação limitada no cavalo devido ao elevado risco de trauma para o animal e para o operador (Stover *et al.*, 1981) bem como pela frequente contaminação do sémen com urina (Cary *et al.*, 2004).

### Recolha de sémen através de vagina artificial

A técnica de recolha de sémen mais utilizada é através da vagina artificial (VA), visto que é a mais eficiente e económica, minimizando riscos para o garanhão e optimizando a fertilidade (Foote, 2002). Há uma miríade de VA de

diferentes formas, tamanhos e cores, sendo que actualmente as mais utilizadas podem dividir-se em quatro tipos.

A primeira foi desenvolvida pela Laboratório de Reprodução Animal de Fort Collins da Universidade de Colorado. O modelo denominado “Colorado”, é um modelo largo, robusto e extremamente pesado (mais de 5 kgs quando preparada), que mede 59 cm de comprimento, tem diâmetro interno de 15 cm e pesa mais de 5kg quando preparada. A preparação desta vagina exige cerca de 4,5 kg de água a uma temperatura de 60°C, de forma a obter a pressão e temperatura interna (46°C) desejada. A grande desvantagem é o seu elevado peso e o facto da ejaculação ocorrer na porção da VA que tem água quente (aumentando a possibilidade de choque térmico) (Allen, 2005). Os danos causados pela temperatura ocorrem facilmente quando os gâmetas masculinos são sujeitos a temperaturas superiores a 43°C (Love, 1992). A grande vantagem desta VA é a capacidade de manter constante a temperatura interna devido aos grandes volumes de água (Allen, 2005).

A VA modelo “Missouri”, é composta por duas mangas de borracha seladas envolta numa protecção de couro. Tem como grande desvantagem, o abaixamento rápido da temperatura interna, especialmente em dias frios (Allen, 2005, Love, 1992). No entanto, é provavelmente a VA mais utilizada no mundo (Rocha, comunicação pessoal), pois é bastante fácil de preparar, possui um baixo peso e a ejaculação ocorre fora da porção aquecida da vagina, evitando o choque térmico dos espermatozóides (Allen, 2005). Adicionalmente, em garanhões refractários/relutantes à ejaculação na vagina artificial, a característica do modelo “Missouri” permite a colocação de uma toalha entre a protecção de couro e a manga de borracha na abertura proximal da VA. A toalha saturada em água quente pode ser aplicada na base do pénis, durante a recolha, providenciando um estímulo adicional para obter uma ejaculação (Rocha *et al.*, 2008).

O modelo “Hannover” consiste num invólucro de plástico resistente, em que a entrada proximal da VA possui um largo diâmetro e a entrada distal possui um pequeno diâmetro prevenindo a passagem da glândula do pénis para fora da porção aquecida, mimetizando o fórnix vaginal da égua. Apesar de ser de fácil montagem e de ser bem aceite pelos garanhões, a probabilidade de danificar os espermatozóides, por choque térmico, é mais alta do que no modelo “Missouri” (Allen, 2005).

Por fim o modelo “Cracóvia”, é uma versão mais pequena do modelo “Colorado”, que permite, ao contrário do modelo “Colorado”, que a ejaculação ocorra fora da porção aquecida (Allen, 2005).

Para a execução da recolha de sémen é necessário ter uma égua disponível, de preferência em cio, ou um manequim de recolha. Momentos antes da recolha de sémen coloca-se o copo colector do sémen e uma manga sanitária de plástico (facultativo, depende do modelo da VA e da sensibilidade do garanhão). De seguida, a VA é enchida com água quente de forma a atingir uma temperatura interna de 44-48°C. A utilização de uma temperatura acima da temperatura normal da égua (38,5°C) parece estimular o pénis e a ejaculação (Allen, 2005) e de facto alguns garanhões podem necessitar temperaturas de até 63°C (Rocha *et al.*, 2008). A superfície interna da VA deve estar lubrificada com um lubrificante não espermicida.

### Recolha de sémen através de ejaculação química

A ejaculação química é de interesse para casos em que o garanhão apresenta patologias músculo-esqueléticas graves, que o impedem de executar os movimentos de monta. Esta técnica não implica um aumento do esforço músculo-esquelético por parte do garanhão, pelo contrário induz relaxamento muscular, não implica o uso de uma vagina artificial e ainda minimiza o contacto com o operador. Existem vários protocolos de ejaculação química (Card *et al.*, 1997; McDonnel, 2001; McDonnel *et al.*, 1987), sendo que o cloridrato de imipramina, um antidepressivo para humanos, associado ao cloridrato de xilazina, um alfa2 agonista (McDonnel, 2001) teve melhores resultados na obtenção de ejaculados que utilizados para IA produziram gestações (Card *et al.*, 1997).

O cloridrato de imipramina, um antidepressivo tricíclico, estimula a erecção, emissão e diminui o limiar de estimulação para obter uma ejaculação, enquanto o cloridrato de xilazina possui uma acção de contracção sobre a musculatura lisa do aparelho genital. A autora que mais contribuiu para a investigação desta técnica, Sue McDonnel, descreve uma taxa de 53% de ejaculações quando se aplica este tratamento combinado (McDonnel, 2001). No CRAV (dados não publicados) obtivemos uma taxa de sucesso de 33.3% (3 em 10 garanhões).

### Recolha de reservas espermáticas extra-gonadais

Todos os anos garanhões potencialmente férteis, alguns atletas de grande valor comercial, morrem inesperadamente devido a cólicas terminais e a lesões traumáticas. Outros são sujeitos a castrações de emergência devido a hérnias inguino-escrotais, causando uma perda irreversível de genes comercialmente valiosos. Para estes casos, a única forma de preservar a capacidade reprodutora é fazendo a recolha das reservas espermáticas extra-gonadais. De facto, as duas caudas de epidídimos de garanhões adultos normais, sexualmente em descanso, devem conter aproximadamente  $54 \times 10^9$  espermatozóides, o que corresponde a 61% das células espermáticas presentes nos ductos de condução seminal (Bruemmer, 2006).

A colheita dos espermatozóides da cauda do epidídimo pode ser realizada pelo método de “flushing” (fluxo retrógrado) ou de “floating” (fragmentação do epidídimo), sendo que se obtém a mesma (Eichelberger *et al.*, 2007) ou até cinco vezes mais quantidade de espermatozóides com o primeiro método (Bruemmer, 2006).

Após a morte ou castração do garanhão, os espermatozóides permanecem viáveis apenas por algum tempo, até que a decomposição dos tecidos afecte a sua viabilidade (Murádas *et al.*, 2006). A maioria das mortes súbitas ou castrações de emergência ocorrem geralmente em locais geograficamente distantes do laboratório de criopreservação, requerendo geralmente até 24 h de transporte das gónadas para chegar ao laboratório de criopreservação. A 22°C a viabilidade dos espermatozóides da cauda do epidídimo decresce abruptamente após as 24 h, mas se o complexo testículo-epidídimo for refrigerado a 4°C podem-se obter bons resultados de viabilidade espermática (James *et al.*, 2002).

A refrigeração dos complexos testículo-epidídimo a 4°C por 24 h após a orquiectomia, antes de criopreservação dos espermatozóides da cauda do epidídimo, demonstrou ser uma técnica sem efeitos deletérios na motilidade após descongelação quando comparados com os espermatozóides da cauda do epidídimo criopreservados imediatamente após orquiectomia (Bruemmer *et al.*, 2002). No entanto, vários autores indicaram que os parâmetros pós-descongelação dos espermatozóides epididimários são de pior qualidade quando comparados com parâmetros seminais pós-descongelação de sémen ejaculado (Morris *et al.*, 2001; Neild *et al.*, 2006; Papa *et al.*, 2008). Não obstante, já se

obtiveram gestações com espermatozóides da cauda do epidídimo após congelação-descongelação (Barker e Gandier, 1957; Morris *et al.*, 2001).

É também de salientar, que o envio por correio urgente das gónadas refrigeradas tem um custo não negligenciável. Podia-se reduzir o volume e peso do transporte, e consequentemente o preço de transporte, enviando apenas a suspensão de espermatozóides da cauda do epidídimo num diluidor de refrigeração. Assim, existe a necessidade de desenvolver protocolos eficientes de refrigeração (gónadas *versus* suspensão de espermatozóides epididimários) pré-criopreservação mais económicos, bem como protocolos de congelação para espermatozóides da cauda do epidídimo que melhorem os parâmetros espermáticos após descongelação tornando-os comparáveis com os parâmetros pós-descongelação de sémen ejaculado.

Convém enfatizar, que no caso da recolha e criopreservação das reservas extra-gonadais do garanhão, visto ser executada em situações de emergência e em último recurso, nem todos os protocolos sanitários estipulados pela UE para a comercialização intracomunitária de sémen ejaculado criopreservado são exequíveis. O protocolo sanitário implica a quarentena do garanhão doador, dois exames virológicos (arterite viral equina e anemia infecciosa equina) e três exames microbiológicos seriados (*Taylorella equigenitalis*), sendo que a quarentena e os dois últimos exames microbiológicos não são possíveis de executar após a morte do animal. Assim, de modo a avançar com o processo de reconhecimento da técnica e a legislação do transporte intracomunitário de sémen do epidídimo criopreservado por parte da UE, é mandatório confirmar a inexistência de bactérias na cauda do epidídimo, de forma a gizar um protocolo igualmente seguro a nível sanitário.

### **Processamento e avaliação de sémen e/ou suspensão de espermatozóides**

Logo após a colheita, independentemente do método de recolha, os espermatozóides devem ser transportados até ao laboratório minimizando o trauma, a exposição à luz, ao choque térmico (frio e calor) e, no laboratório, devem ser mantidos a uma temperatura constante (37-38°C).

O sémen obtido por ejaculação deve ser filtrado através de um filtro estéril e não tóxico, para remover a fracção de gel e os detritos celulares, e avaliada a sua



concentração, volume e outros parâmetros seminais (Brinsko, 2011; Pickett, 1993). O volume do ejaculado é quantificado no copo de colheita e a concentração de espermatozóides é obtida através de um espectofotómetro ou então com recurso a uma câmara de Neubauer (Brinsko, 2011; Pickett, 1993).

Existe uma grande variedade parâmetros que podem ser aferidos em qualquer tipo de suspensão espermática mas iremos debruçar-nos apenas nos utilizados ao longo desta tese: a concentração, a motilidade, a morfologia e a integridade da membrana plasmática dos espermatozóides. Estes parâmetros espermáticos até à data, estão pouco correlacionados com a fertilidade (Colenbrander *et al.*, 2003; Katila, 2001).

A avaliação da motilidade é central na avaliação dos parâmetros espermáticos, apesar de ser geralmente aceite que a avaliação *in vitro* de outros parâmetros poderão no futuro (por comprovar cientificamente) ser mais importantes na predição da fertilidade (Katila, 2001). A avaliação de motilidade é extremamente importante por várias razões: reflecte vários aspectos do metabolismo espermático, comprova a capacidade dos espermatozóides de se deslocarem até ao ócito e é o parâmetro mais fácil e rápido de avaliar (Colenbrander *et al.*, 2003; Katila, 2001).

A motilidade progressiva dos espermatozóides *in vitro* está pouco correlacionado com a fertilidade, mas se a motilidade for muito baixa é provavelmente um bom indicador para a não utilização do sémen em programas de reprodução (Katila, 2001), pois a probabilidade de se obterem resultados medíocres é elevada.

A avaliação da motilidade progressiva pode ser estimada de forma subjectiva através do microscópio óptico ou objectivamente através de “software” instalado num computador ligado ao microscópio. Em ambos os casos, de forma a obter estimativas o mais precisas possível, as condições ambientais devem estar estandardizadas e optimizadas para a avaliação (Brinsko, 2011; Katila, 2001; Pickett, 1993). Todos os materiais (placa térmica, copo de colheita, diluidor de sémen, laminas, lamelas, microscópio) que entram em contacto com os espermatozóides deverão ser mantidos a 37°C, durante a avaliação (Katila, 2001).

A avaliação subjectiva da motilidade é feita através de um microscópio óptico (com ampliação de 200x) em que o operador observa vários campos da amostra de espermatozóides colocada entre a lâmina e a lamela. A avaliação

subjectiva tende a ser imprecisa (Davis e Katz, 1993; Katila, 2001) sendo observáveis grandes variações causadas por diferenças entre operadores e/ou factores humanos variáveis intrínsecos a cada operador (Katila, 2001).

A forma mais precisa/objectiva de avaliação da motilidade é através de um sistema análise de espermatozóides assistido por um computador (CASA). O primeiro sistema CASA foi desenvolvido há cerca de quatro décadas e desde então tem sido utilizado em laboratórios de andrologia animal e humana. O CASA consiste na conexão tripla de uma câmara, um microscópio e um computador com software especializado. Assim, as células espermáticas são reconhecidas, filmadas e todo o seu trajecto é monitorizado (Amann e Wabersky, 2014). O estabelecimento dos critérios técnicos de avaliação é o ponto crítico, pois diferentes critérios e diferentes modos de preparação da amostra possuem grande impacto nos resultados obtidos (Contri *et al.*, 2010; Lenz *et al.*, 2011; Rijsselaere *et al.*, 2002). Apesar deste sistema oferecer vantagens ao nível da rapidez de análise, repetibilidade, ausência de subjectividade na avaliação da motilidade e dos parâmetros de velocidade (Amann e Wabersky, 2014; Contri *et al.*, 2010), que são desejáveis para investigação, não consegue predizer a fertilidade do sémen (Amann e Wabersky, 2014), tal como acontece com a avaliação subjectiva (Katila, 2001).

A morfologia e a integridade da membrana plasmática dos espermatozóides (viabilidade) são avaliadas através da observação, ao microscópio óptico, de um esfregaço espermático corado (coloração convencional) (Brito, 2007; Katila, 2001). De seguida, devem-se examinar 200 células, mas a avaliação de apenas 100 células provavelmente é representativa do ejaculado (Katila, 2001). As colorações de fluorescência para avaliação morfológica e de integridade de membrana não foram utilizadas nesta tese. No entanto, estas técnicas apesar de não serem utilizadas por rotina, são extremamente úteis em casos de morfologias espermáticas infrequentes (Katila, 2001).

Há vários sistemas de classificação da morfologia espermática, pois é um tema bastante controverso. Os mais utilizados são os sistemas que hierarquizam os defeitos ou que contabilizam cada anomalia nos espermatozóides observados (espermogramas diferenciais) (Brito, 2007). A hierarquização pode-se basear na origem da anomalia (primários quando ocorrem durante a espermatogénese e secundários quando ocorrem no trânsito extra-gonadal) ou no efeito potencial

sobre a fertilidade (maiores e menores) (Brito, 2007). No espermograma diferencial há contagem das várias categorias de espermatozóides, normais, com anomalias da cabeça, com anomalias do acrossoma, com gotas citoplasmáticas proximais, com gotas citoplasmáticas distais, com anomalias da peça intermédia, com anomalias da cauda e também a presença de outras células tais como espermátogónias, glóbulos brancos e glóbulos vermelhos. O facto de muitos defeitos serem de origem desconhecida e os efeitos na fertilidade de cada anomalia estarem pouco estudados no garanhão, fez com que provavelmente o sistema mais utilizado seja espermograma diferencial (Brito, 2007). A ausência de estudos de morfologia espermática, associados à grande variabilidade na morfologia nos garanhões impede a criação de uma tabela ou intervalos numéricos para o que é considerado normal, para cada anomalia (Brito, 2007). Adicionalmente, a relação do decréscimo de fertilidade com o aumento de anomalias espermáticas ainda é um tema controverso (Katila, 2001).

Assim, uma grande variedade de anomalias morfológicas é aceitável desde que o número de espermatozóides normais e móveis por ejaculado seja adequado, no mínimo  $1000 \times 10^6$  (Brito, 2007; Katila, 2001).

Os testes para avaliação da integridade da membrana plasmática, baseiam-se na capacidade de membranas plasmáticas de espermatozóides viáveis impedirem a entrada dos corantes (Katila, 2001). Esta avaliação é de especial relevo no caso de espermatozóides criopreservados/descongelados, devido aos danos esperados na membrana plasmática que acontecem durante o processo de criopreservação (Colenbrander *et al.*, 2003).

### **Criopreservação de células espermáticas**

A criopreservação produz sobre os espermatozóides uma grande quantidade de stress. Durante o processo de criopreservação as células espermáticas são expostas aos componentes do diluidor (por exemplo: crioprotector), à refrigeração, a alterações de membrana e intracelulares devido a desidratação e a danos por formação de cristais de água (Barbas e Mascarenhas, 2009; Hammerstedt *et al.*, 1990; Mazur, 1984; Oldenhof *et al.*, 2012; Sieme *et al.*, 2008). Nos equinos, a variabilidade na resposta à criopreservação, parece ser de origem genética e geralmente não está correlacionada com a fertilidade do

garanhão quando executa monta natural (Allen, 2005; Kuisma *et al.*, 2006; Loomis e Graham, 2008; Vidament *et al.*, 1997). Estima-se que 20% dos garanhões produzem sémen que congela “bem”, 60% congela de forma “aceitável” e nos restantes 20% congela “mal”, sendo que esta classificação é feita em base da qualidade dos parâmetros seminais pós-descongelção (Kuisma *et al.*, 2006; Loomis e Graham, 2008; Vidament *et al.*, 1997).

A membrana plasmática do espermatozóide é constituída por lípidos (essencialmente fosfolípidos e colesterol) e proteínas dispostas numa bicamada lipídica, sendo que as terminações lipídicas hidrofílicas são externas e as terminações lipídicas hidrofóbicas internas. Este arranjo lamelar cria uma barreira hidrofóbica, que dificulta a passagem de água e moléculas nela dissolvidas. O transporte normal de moléculas através da membrana plasmática acontece através canais e poros formados por proteínas constitutivas da membrana plasmática. A membrana plasmática é considerada “fluida” à temperatura do corpo, pois os diferentes fosfolípidos estão dispostos aleatoriamente na estrutura lamelar da membrana plasmática e movem-se lateralmente de forma livre nas bicamadas fosfo-lipídicas (Hammerstedt *et al.*, 1990).

À temperatura de refrigeração de 4°C, a fase “líquida membranar” muda para um estado cristalino, reorganizando a forma das moléculas fosfolipídicas (Hammerstedt *et al.*, 1990; Mazur, 1984; Oldenhof *et al.*, 2012). Quando a redução da temperatura é mais rápida, há grupos de fosfolípidos que se dispõem circularmente e invertem a sua posição (cabeça hidrofílica internamente e as cadeias de ácidos gordos hidrofóbicas externamente), aumentando a permeabilidade da membrana plasmática. Após reaquecimento estas alterações podem não ser reversíveis (Hammerstedt *et al.*, 1990).

No estado cristalino os fosfolípidos não conseguem mover-se livremente fixando as proteínas integrais em pequenas regiões que possuem fosfolípidos líquidos. Esta agregação das proteínas resulta num aumento da permeabilidade da membrana e diminuição da sua actividade metabólica (Hammerstedt *et al.*, 1990; Oldenhof *et al.*, 2012).

Abaixo de 0°C começa a formação de cristais de gelo no espaço extracelular. Como consequência, o volume de água livre extracelular diminui, aumentando a concentração de sais e outras substâncias activas a nível osmótico (como açúcares), resultando na criação de um ambiente extracelular hipertónico.

Assim, a água intracelular é recrutada para o ambiente extracelular, por osmose, levando à desidratação progressiva das células (Mazur, 1984). Quando a velocidade de arrefecimento ocorre de forma lenta mas constante, as células espermáticas mantêm-se perto do equilíbrio osmótico perdendo água para meio extracelular à mesma velocidade que se formam cristais de água nesse meio. Em contraste, se a velocidade de arrefecimento ocorrer rapidamente, a formação de cristais extracelulares suplanta a capacidade da célula de libertar água. O arrefecimento a baixa velocidade induz lesões pela exposição a altas concentrações de solutos (hiperosmolaridade). O arrefecimento a alta velocidade induz lesões pela formação de cristais de gelo, intra e extracelulares. Assim, a curva óptima de arrefecimento encontra-se entre estes dois extremos (Barbas e Mascarenhas, 2009; Oldenhof *et al.*, 2012).

A adição de agentes crioprotectores (CPA's) ao meio de criopreservação, aumenta substancialmente a taxa de sobrevivência dos espermatozóides após criopreservação e descongelação. Há dois tipos de CPA's, penetrantes e não penetrantes, dependendo da sua capacidade de atravessar a membrana celular (Barbas e Mascarenhas, 2009; Sieme *et al.*, 2008). Os agentes penetrantes difundem-se através da membrana plasmática equilibrando o citoplasma. A sua presença altera o ponto de congelação, diminui a formação de cristais de gelo, e diminui a concentração dos sais, actuando como solventes secundários. Assim, os CPA's penetrantes diminuem as lesões induzidas por arrefecimento lento, mas ao contrário oferecem pouca protecção para o arrefecimento rápido (Barbas e Mascarenhas, 2009; Hammerstedt *et al.*, 1990; Mazur, 1984; Sieme *et al.*, 2008).

Os agentes não penetrantes actuam no espaço extracelular, diminuindo a formação de cristais de gelo (efeito solvente) permitindo a desidratação celular antes que ocorram danos por hiperosmolaridade (Barbas e Mascarenhas, 2009; Hammerstedt *et al.*, 1990; Mazur, 1984; Sieme *et al.*, 2008). Apesar dos CPA's conferirem alguma crioprotecção, as lesões continuam a ocorrer.

O CPA mais utilizado nas várias formulações de diluidores comerciais é o glicerol. Recentemente, foi desenvolvido o Botucrio®, que contém como CPA's penetrantes uma mistura de glicerol e dimetilformamida (Alvarenga *et al.*, 2005; Melo *et al.*, 2007). A dimetilformamida foi testada para congelação de espermatozóides de garanhões com diferentes qualidades de sêmen e os resultados obtidos em termos de avaliação *in vitro* dos espermatozóides

congelados/descongelados e de fertilidade após inseminação parecem promissores (Melo *et al.*, 2007). Depois de vários testes preliminares utilizando vários tipos de meios de congelação (dados não publicados), o nosso grupo de reprodução animal passou utilizar este produto devido a melhorias nos parâmetros seminais pós-descongelação nos ejaculados dos garanhões levados ao Centro de Reprodução Animal de Vairão (CRAV).

### **Inseminação Artificial**

A primeira técnica de reprodução assistida aplicada com êxito em equinos, poderá ter ocorrido em 1322. Segundo uma história, apócrifa ou não, um espião de uma certa tribo árabe foi enviado para recolher sémen de um garanhão de outra tribo num acampamento próximo. A recolha terá sido feita através da colocação de uma esponja na vagina de uma égua recém coberta pelo dito garanhão. O conteúdo seminal obtido nessa esponja terá sido diluído em leite de camelo e armazenado num saco de pele de cabra. De volta ao acampamento, essa esponja terá sido colocada na vagina da égua do chefe do acampamento. Não são feitas descrições pormenorizadas, quanto à diluição e à técnica de deposição da esponja, mas os relatos históricos garantem o nascimento de um belo e saudável poldro no ano seguinte (Allen, 2005; Bowen, 1969).

A IA em cavalos só foi descrita no fim do século XIX, por Sir Walter Heap, onde é referenciada a execução de recolha de sémen num garanhão e IA de éguas (Allen, 2005; Bowen, 1969). De seguida, vem um hiato de 40 anos, em que não há referências desta técnica até aos estudos conduzidos pelo britânico Sir John Hammond. Este aplicou a IA cruzando éguas poney (Poney de Shetland) com sémen de cavalos de raças grandes (Shire) e vice-versa, com o objectivo de investigar o efeito do tamanho uterino no tamanho do poldro ao nascimento bem como a taxa de crescimento subsequente (Allen, 2005).

Entre 1930 e 1960, quer os russos quer os chineses aplicaram rotineiramente a IA em éguas com sémen fresco, sendo que está descrito por um cientista chinês em 1959 a inseminação de 600 000 éguas (Allen, 2005). Acredita-se que estas duas nações tenham feito extensas investigações fundamentais na área da criopreservação de sémen, mas infelizmente não chegaram ao Ocidente por questões linguísticas ou pelos efeitos da Guerra-Fria (Allen, 2005).

No ocidente, o interesse científico em relação à base fisiológica dos factores que afectam a espermatogénese, os métodos de colheita, a diluição, a criopreservação e inseminação artificial com sémen de garanhão, cresce em meados de 1960 no Laboratório de Reprodução Animal de Fort Collins (Colorado, Estados Unidos da América) sob a égide do Professor B.W.Pickett (Allen, 2005). Este foi o despoletar do interesse nos avanços da técnica de IA até aos dias de hoje. Apenas nas raças de corrida (“Thoroughbred”) esta e outras técnicas de reprodução assistida persistem em ser proibidas (Allen, 2005).

Actualmente, a técnica de IA é considerada simples. O operador equipado com uma luva obstétrica estéril, deposita no lúmen uterino (por via vaginal) os espermatozóides através de um cateter esterilizado acoplado a uma seringa contendo o sémen (Bowen, 1969).

Nas últimas duas décadas observou-se na Europa Ocidental um grande aumento na utilização da IA em cavalos (Allen, 2005; Aurich e Aurich, 2006), em muito devido aos avanços na conservação de sémen e às vantagens inerentes da técnica. Entre os vários benefícios da IA, devemos salientar que esta evita os transportes de longa distância das éguas com o propósito reprodutivo, e permite aceder a um maior leque de garanhões (Allen, 2005). Também evita a exposição dos animais a patologias venéreas e não venéreas e economicamente esta técnica foi revolucionária, permitindo que apenas uma recolha de sémen possa servir várias éguas dependendo da quantidade de espermatozóides (Allen, 2005).

O sémen da maioria dos garanhões sobrevive a refrigeração lenta até 4°C mantendo uma boa fertilidade durante 48-72 h (Batellier *et al.*, 2001), permitindo o seu transporte por longas distâncias dentro desse intervalo. Actualmente, em certos locais, mais de 90% das éguas são inseminadas com sémen refrigerado (Aurich e Aurich, 2006). Se bem que em menor escala, a IA com sémen congelado é também bastante utilizado. De acordo com os números apresentados em França no ano de 2012 foram registados 85296 aplicações de técnicas reprodutivas em éguas, das quais 33567 foram por IA (sémen fresco/refrigerado/congelado), e as restantes 51729 cobrições foram feitas recorrendo a monta natural (<http://statscheval.haras-nationaux.fr/core/tabbord.php?zone=229&r=1320>). Apesar do sémen criopreservado potencialmente poder ser armazenado para sempre em azoto líquido (Allen, 2005; Hammerstedt *et al.*, 1990), a sua menor utilização prende-se

essencialmente com resultados de fertilidade menores quando comparados com o sémen refrigerado (Allen, 2005).

Em Portugal, o uso desta técnica de reprodução assistida acompanhou a tendência europeia, através de um incremento notório da sua requisição por parte dos proprietários de equinos, com especial incidência para a IA com sémen refrigerado. Há já alguns grupos a executarem mais de 200 inseminações artificiais ao ano, incluindo com sémen de reprodutores nacionais, o que estimula a actividade técnica relacionada com a colheita, avaliação, refrigeração e congelação de sémen (Rocha A, comunicação pessoal). Alicerçando estas afirmações, estão a criação de dois novos centros de recolha e congelação de sémen certificados pela União Europeia (UE) em Portugal entre 2011 e 2013, perfazendo um total de 3 centros a operar em Portugal actualmente.

O aumento de aplicação da IA, com sémen fresco, refrigerado e criopreservado, incentivou a realização de estudos fundamentais sobre os efeitos das bactérias, dos tipos de diluidores de sémen, da variação da sensibilidade à refrigeração e congelação (Althouse *et al.*, 2010; Alvarenga *et al.*, 2005; Bowen, 1969; Katila, 2001). Apesar deste incremento, nenhum estudo foi efectuado tendo em vista caracterizar o tipo e prevalência de bactérias (patogénicas e não patogénicas) presentes no pénis e sémen de equinos em Portugal.

O pénis (uretra, fossa uretral e prepúcio) apresenta um alto índice de contaminação por bactérias não patogénicas, bactérias potencialmente patogénicas, e de fungos (Aurich e Spergser, 2007; Bristol, 1991; Madsen e Christensen, 1995; Varner *et al.*, 1998). A grande quantidade e diversidade da microflora no garanhão deve-se à anatomia específica da sua genitália, composta por grande quantidade de pregas da mucosa e presença de esmegma no pénis transformando-se num local óptimo para crescimento da população bacteriana (Madsen e Christensen, 1995).

Quando a microflora bacteriana normal do pénis é alterada, por lavagens ou aplicação de antibióticos/antisépticos, poderá levar à colonização do pénis por espécies patogénicas (Aurich e Spergser, 2007; Bowen *et al.*, 1982). A microflora comensal é essencialmente representada por estafilococos coagulase-negativo, corinebactérias e estreptococos alfa-hemolíticos (Bristol, 1991; Varner *et al.*, 1998). Estão também descritos na genitália externa microorganismos patogénicos facultativos tais como *Escherichia coli*, *Streptococcus equi zooepidemicus*,



*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* (Bowen *et al.*, 1982; Bristol, 1991; Madsen e Christensen, 1995; Malmgren *et al.*, 1998; Varner *et al.*, 1998).

É também característica uma alta contaminação do sémen ejaculado de garanhão, que não é evitável mesmo com apertadas medidas de sanidade. Acredita-se que esta contaminação ocorre durante a ejaculação, quando o sémen entra em contacto com a uretra distal/fossa uretral/prepúcio (Rota *et al.*, 2011), mas desconhecemos estudos específicos que comprovem esta afirmação. No que concerne ao sémen, o possível efeito de bactérias oportunistas na qualidade espermática continua a ser um tema controverso: Pickett (1993) e Malmgren *et al.* (1998) não encontraram nenhum efeito adverso, ao contrário de outros autores que descreveram uma diminuição da qualidade do sémen refrigerado contaminado com *Streptococcus dysgalactiae equisimilis* e *Pseudomonas aeruginosa* (Aurich e Spargser, 2007; Price *et al.*, 2008).

Deste modo, é imperativo conhecer a frequência dos principais tipos de microrganismos presentes no pénis e sémen dos garanhões em Portugal, especialmente bactérias que, embora presentes no tracto genital dos garanhões não induzem patologia reprodutiva no macho, mas podem afectar o sucesso das técnicas de reprodução assistida (*Escherichia coli*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e o *Streptococcus dysgalactiae equisimilis*), (Madsen e Christensen, 1995; Samper e Tibary, 2006).

Quando falamos de enfermidades venéreas, não podemos deixar de referir a *Taylorella equigenitalis*, agente bacteriano causador da Metrite Contagiosa Equina e de declaração obrigatória à “World Organisation for Animal Health” (OIE). O primeiro surto descrito, de *Taylorella equigenitalis*, no Reino Unido ocorreu em 1977 e estima-se que teve um impacto económico de 13.55 milhões de dólares (perda dos valores de cobrição, éguas que não ficaram prenhas, restrições ao movimento dos animais) (Timoney, 2010). De acordo com a OIE o primeiro e último registo de um surto em Portugal foi em 14/3/2011 ([http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Countryinformation/Animalsituation](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Animalsituation)).

Apesar dos garanhões portadores de *Taylorella equigenitalis* serem assintomáticos, esta bactéria é altamente contagiosa, com grande impacto na fertilidade da égua (vaginites, cervicites, endometrites) (Timoney, 2010). A

*Taylorella equigenitalis* não foi investigada nestes estudos, pois não faz parte da microflora comensal do garanhão que queremos definir.

No seguimento da descrição da microflora comensal da genitália externa do garanhão, convém descortinar se existem diferenças na microflora da genitália dos garanhões reprodutores e a de animais inteiros não reprodutores, e se possível sinalizar quais as bactérias que aparecem em cada subgrupo.

Alguns autores descreveram várias fontes potenciais de contaminação, tais como pele/pêlo do animal, excreções respiratórias, flora intestinal, fonte de água, instalações, alimentação e os próprios seres humanos (Althouse *et al.*, 2010; Samper e Tibary, 2006). O tipo e quantidade de bactérias presentes no sémen parecem depender do local geográfico em que os animais se encontram (Malmgren *et al.*, 1998).

Por outro lado, a égua adaptou-se evolutivamente, possuindo mecanismos que previnem a contaminação do lúmen uterino por microorganismos, após cobrição natural em que há inoculação da microflora proveniente do pénis/sémen do garanhão. O seu aparelho reprodutivo possui barreiras anatómicas (vulva, ânulo vestibular vaginal e cérvix) e mecanismos de resistência e limpeza do útero após cobrição. Estes mecanismos de defesa são a contractilidade uterina, a superfície ciliada do endométrio, muco cervical (composto por lisossimas e imunoglobulinas) e a acção do sistema linfático (Lu e Morressey, 2006).

Os microorganismos potencialmente patogénicos, apesar dos mecanismos de defesa da égua, podem causar inflamação do útero e infertilidade em éguas, especialmente nas susceptíveis (Hughes e Loy, 1975; Malmgren *et al.*, 1998; Samper e Tibary, 2006). Lu e Morressey (2006) classificam as éguas como susceptíveis quando possuem uma redução marcada da frequência, intensidade e duração da actividade mioelétrica uterina, resultando no atraso da limpeza mecânica do útero. Este grupo inclui entre outras, éguas com idade avançada que frequentemente apresentam endometrose (fibrose severa do endométrio), uma patologia directamente relacionada com falhas na concepção, perda de embrião/feto e com o aumento da susceptibilidade a infecção uterina (Szóstek *et al.*, 2012). Estes factos são particularmente relevantes em cavalos de desporto, pois a selecção das éguas para programas de reprodução (tal como os garanhões) ocorre frequentemente no fim da carreira desportiva (a partir dos 16-17 anos de vida) após boas “performances” desportivas, coincidindo com a idade

em que existe uma diminuição actividade mioeléctrica uterina e maior probabilidade de padecerem de endometrose.

Assim, apesar dos microorganismos potencialmente patogénicos comensais da genitália externa do garanhão estarem identificados como causadores de endometrites (Frontoso *et al.*, 2008), está por estabelecer a relação entre as bactérias presentes no sémen e a fertilidade após técnicas de reprodução assistida (monta natural e IA), e a qualidade dos embriões equinos após recolha para transferência embrionária (TE).

### **Transferência Embrionária**

Apesar do cavalo ter sido provavelmente a primeira das espécies pecuárias a ser sujeita à técnica de IA, foi talvez a última a ser sujeita a transferência de embrião (TE). O desenvolvimento desta técnica em equinos nas décadas de 70 e 80 foi muito lento, em parte devidas às restrições impostas pelos “studbooks” das raças na inscrição de descendência resultante de TE e em parte também devido às baixas taxas de sucesso da técnica nessa altura (Allen, 2005). As primeiras descrições de TE com sucesso ocorreram em 1972 para asininos, e em 1974 para equinos, (Allen, 2005). Nos anos 90 ocorreu um aumento exponencial na requisição desta técnica na Argentina (especialmente em éguas de pólo) (Allen, 2005). Actualmente, de acordo com o relatório da estatística mundial de transferências embrionárias em espécies pecuárias, o Brasil, Argentina e Estados Unidos da América lideram o número de transferências embrionárias com cerca de 12400, 8480 e 4966 embriões, respectivamente (Stroud, 2011). A Europa apresenta apenas 289 transferências embrionárias executadas em 2010 (Stroud, 2011), mas o número de transferências está a crescer anualmente (Allen, 2005).

A técnica que denominamos como TE, é composta na realidade por duas técnicas combinadas, a recolha de embrião e a TE propriamente dita. Para a recolha do embrião, o aparelho reprodutivo da égua dadora é monitorizado ecograficamente e a IA é executada da mesma forma. A monitorização ecográfica é o ponto crítico na determinação exacta do dia de ovulação, de forma a sabermos a data da fertilização (Allen, 2005; Hinrichs e Choy, 2005). Após cinco dias da fertilização, o embrião passa do oviducto para o útero da égua dadora, onde cresce muito rápido (Battut *et al.*, 2000). A lavagem uterina para recolha do

embrião ocorre tipicamente entre o dia 7-8 pós-ovulação (Hinrichs e Choy, 2005). O cérvix da égua dadora em diestro encontra-se linear e distendido, simplificando o processo manipulativo de passagem do cateter através do cérvix (via vagina) até ao corno uterino. Subsequente enche-se o balão circular (que se encontra na extremidade proximal do cateter) com ar, ocluindo o os *cervix* (Allen, 2005). De seguida, enche-se o útero com um 1-2 litros de meio comercial de lavagem ou Lactato de Ringer. Adicionalmente recomenda-se o baloteamento manual do útero através do recto, de forma a expor o embrião ao meio que se encontra entre as pregas do endométrio. A recolha do meio de lavagem e potencialmente do embrião é feita por gravidade, passando por um filtro, que posteriormente vai ser pesquisado à lupa estereoscópica (Allen, 2005).

A taxa de recolha de embrião varia de acordo com vários factores (dia de recolha do embrião, número de ovulações, idade da égua dadora e qualidade do sémen a inseminação), mas em programas comerciais de TE é de aproximadamente de 50% em éguas com apenas uma ovulação (Squires *et al.*, 2003).

Após localização do embrião, este é avaliado e classificado (grau I a IV-classificação desenvolvida na Universidade do Colorado) (McCue *et al.*, 2009). De seguida, é lavado e transferido (Allen, 2005; Hinrichs e Choy, 2005). O processo de lavagem do embrião, tem por objectivo remover o máximo de detritos que acompanham o embrião no meio de lavagem do útero, e é executado através da passagem do embrião em várias gotas distintas de meio de manutenção do embrião (McCue *et al.*, 2009).

A avaliação do embrião (grau desenvolvimento, qualidade e tamanho) é um ponto crítico em programas de TE, permitindo aferir a taxa de desenvolvimento do embrião e também diferenciá-lo de outras estruturas que aparecem no meio de lavagem uterina (oócitos não fertilizados, células do endométrio) (McCue *et al.*, 2009). De acordo com autores que têm vasta experiência em programas de TE 95.5% dos embriões recolhidos de éguas são de excelente a boa qualidade (grau I e II), devido ao transporte selectivo de embriões no oviducto (McCue *et al.*, 2009). Embriões de má qualidade (grau III) ou mortos/degenerados (grau IV), tem mais probabilidade de ficar retidos no oviducto (McCue *et al.*, 2009).

Existem várias técnicas de TE, mas basicamente podemos dividi-las em duas: a cirúrgica e a não cirúrgica. Independentemente da técnica, a égua

receptora do embrião tem de estar sincronizada com a égua dadora (ovulação da receptora tem de ter ocorrido 1 dia antes ou até 3 dias depois da égua dadora) (Allen, 2005; Hinrichs e Choy, 2005)

A técnica cirúrgica consiste na exteriorização do corno uterino da égua receptora (sob sedação ou anestesia geral) e injeção do embrião no lúmen uterino com uma agulha de 18 ga. A grande vantagem da técnica cirúrgica é a alta taxa de prenhez por transferência (75-90%), mas as desvantagens são múltiplas, nomeadamente os custos muito elevados, o desconforto da égua receptora e os riscos inerentes à sedação/anestesia/cirurgia (Allen, 2005).

A técnica não cirúrgica, é sem dúvida a mais simples e a mais utilizada. A passagem transcervical do embrião é executada por via vaginal. O operador equipado com uma luva obstétrica estéril e um cateter longo e flexível, que contém o embrião no meio de transferência, deposita o embrião no lúmen uterino (Allen, 2005; Hinrichs e Choy, 2005). As vantagens desta técnica são a simplicidade, os baixos custos e uma taxa de sucesso razoável a boa. Sendo que a grande desvantagem é a contaminação inadvertida do útero com as bactérias comensais da vagina (Allen, 2005). A taxa de prenhez aos 45 dias de gestação por TE não cirúrgica varia entre 30-75%, pois depende de uma série de factores (idade da égua dadora, grau de sincronia da égua receptora, tonicidade uterina e cervical da égua receptora, qualidade do embrião) (Squires *et al.*, 2003). Outro factor muito importante é a habilidade e experiência do operador de TE: quantas mais transferências tiver executado mais habilidade adquire, diminuindo a contaminação e melhorando taxas de prenhez (Hinrichs e Choy, 2005).

A preocupação em relação à presença de microorganismos no sémen de garanhão levou a utilização profilática rotineira de antibióticos nos diluidores para refrigeração e crioprotecção de sémen, apesar da maioria destes não terem acção antibiótica abaixo dos 15°C (Aurich e Spergser, 2007). De acordo com vários autores, os antibióticos nos meios de diluição de sémen, não garantem a eliminação de microrganismos do sémen (Bowen *et al.*, 1982; Madsen e Christensen, 1995) e podem ter efeitos deletérios na qualidade do sémen (Aurich e Spergser, 2007; Price *et al.*, 2008). Adicionalmente, no que concerne a manutenção de sémen criopreservado a -196°C em azoto líquido, está descrita a inter-contaminação de palhinhas de diferentes indivíduos dentro do mesmo “container” (Bielansky e Vajta, 2009).

Na Europa uma grande quantidade de éguas são reproduzidas por IA (sémen refrigerado e criopreservado) e consequentemente são utilizados grandes volumes de diluidores de sémen com antibióticos (Morrell e Wallgren, 2011). Está descrito que a utilização de pequenas quantidades de antibióticos podem levar ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana (Morrell e Wallgren, 2011). Entretanto são quase inexistentes protocolos alternativos que promovam a diminuição da carga microbológica no sémen, em condições de campo. Assim, por razões óbvias de saúde animal e humana, devem ser desenvolvidos protocolos alternativos de forma a reduzir ou eliminar o uso de antibióticos nos diluidores de sémen.

Uma potencial forma de atingir esse desígnio é através de protocolos de selecção de sémen. Existem várias técnicas disponíveis para a selecção de subpopulações de espermatozóides e esta convém ser diferenciada da separação.

A separação (centrifugação do ejaculado) é o procedimento de execução mais frequente e o seu objectivo é a remoção do plasma seminal da fracção celular (espermatozóides) de um ejaculado. Considera-se que a separação melhora a conservação (refrigeração e criopreservação) do sémen de garanhão, pois apesar da presença de plasma seminal ser considerado benéfico para a função espermática durante a cobrição natural, ele é deletério para a sobrevivência dos espermatozóides (Morrell e Rodriguez-Martinez, 2009). Por outro lado, a selecção espermática tem por objectivo seleccionar uma subpopulação de espermatozóides com determinadas características seminais.

### **Seleccção Espermática**

A selecção espermática pode ser obtida através de três técnicas: migração, filtração e centrifugação num colóide (Morrell e Rodriguez-Martinez, 2009).

A técnica da migração baseia-se na capacidade dos espermatozóides móveis deslocarem-se de uma suspensão para um meio com composição diferente durante um período de incubação (Morrell e Rodriguez-Martinez, 2009). Ou seja, o critério neste caso é a motilidade e não a morfologia, integridade da cromatina, viabilidade ou integridade do acrossoma (Somfai *et al.*, 2002). A grande desvantagem desta técnica é a baixa taxa de recuperação, tornando-a

inexequível comercialmente no caso do garanhão (Morrell e Rodriguez-Martinez, 2009).

A filtração baseia-se no diferente grau de interacção das várias qualidades de células espermáticas com substâncias filtradoras. Os espermatozóides imóveis tendem a aderir mais aos filtros, quando comparados com espermatozóides móveis. Assim, a amostra após a filtração possuirá uma motilidade média maior (Sieme *et al.*, 2008). Apesar de esta técnica ser eficiente na recuperação de sémen (cerca de 63%) e na eliminação de leucócitos, é pouco útil devido à não separação do plasma seminal e dos detritos celulares (Morrell e Rodriguez-Martinez, 2009).

A centrifugação num colóide, baseia-se no princípio do ponto isopícnico durante a centrifugação. Quando se centrifuga espermatozóides ou qualquer outra população celular num colóide, as células movimentam-se para um ponto do gradiente que tenha a mesma densidade (Ford e Graham, 1991). Com este conhecimento, e sabendo a densidade da subpopulação espermática com boa motilidade, viabilidade e integridade da cromatina, podemos seleccionar os espermatozóides desejados centrifugando o sémen através de uma ou mais camadas de colóide com densidades conhecidas (Pertoft, 2000). Esta técnica também separa o plasma seminal.

O primeiro colóide comercial para humano desenvolvido foi o Percoll®, tendo sido restringido a uso não clínico devido à potencial toxicidade do produto (Mortimer, 2000). De seguida, foram desenvolvidos outros protocolos de selecção espermática, essencialmente para aplicação *in vitro*, pois a sua complexidade impedia a sua utilização em condições de campo. No caso do “density gradient centrifugation” (DGC), apesar dos resultados promissores, o limitado volume de sémen que podia ser processado e o tempo consumido na preparação das diferentes camadas de colóide, impediram a sua utilização a nível clínico (Morrell e Rodriguez-Martinez, 2009). Recentemente, foi desenvolvido o “single layer centrifugation” (SLC), que resolveu as limitações do DGC mantendo as suas vantagens (Morrell *et al.*, 2008a). O SLC consegue processar grandes volumes de sémen diluído e como apenas tem uma camada de colóide é de preparação rápida e prática (Morrell *et al.*, 2009). Deste protocolo, nasce a linha de colóides Androcoll, colóides de sílica revestida por glicidoxipropiltrimethoxisilano, com diferentes formulações específicas para várias espécies animais. Androcoll-E

específico para sémen equino (Morrell *et al.*, 2008b; Morrell *et al.*, 2009), Androcoll-C específico para cão (Dorado *et al.*, 2013) e Androcoll-P específico para porcos (Blomqvist *et al.*, 2011; Morrell e Wallgren, 2011).

No sémen de suíno, o protocolo de selecção espermática baseado no Androcoll-P, demonstrou ser capaz de reduzir os títulos de circovírus porcino no sémen (Blomqvist *et al.*, 2011), mantendo inalterados os parâmetros seminais, e também de reduzir a contaminação bacteriana (Morrell e Wallgren, 2011).

Quando aplicado no sémen fresco de garanhão, o Androcoll-E causou um melhoramento significativo de certas características seminais (motilidade, velocidade, integridade acrossómica e morfologia) no sémen fresco e refrigerado por 48h a 5°C (Johannisson *et al.*, 2009) e induziu uma diminuição da variação da sensibilidade individual dos ejaculados à refrigeração (Morrell *et al.*, 2008b) e criopreservação (Hoogewijs *et al.*, 2011). Adicionalmente, obtiveram-se prometedores na redução dos níveis infectantes de Arterite Viral Equina (AVE) em sémen de garanhões excretadores do vírus (Morrell e Geraghty, 2006; Morrell *et al.*, 2013). No entanto, a pesquisa do efeito eliminador ou redutor da carga microbiana em sémen de garanhão ainda estava por testar quando iniciamos o nosso trabalho. Assim, pretendemos avaliar o uso do Androcoll-E como “filtro” de bactérias em amostras de sémen, antes da criopreservação.

A selecção de garanhões para programas de reprodução e criopreservação de sémen é feito em base à sua genética, performance desportiva e características fenotípicas, ao contrário dos animais de produção em que é valorizada a sua capacidade fertilizante (Colenbrander *et al.*, 2003).

Como consequência, a indústria de reprodução equina encontra-se sobrecarregada de garanhões cujo nível de fertilidade está abaixo do pretendido (Varner *et al.*, 2010). Na espécie equina está descrita uma grande variabilidade individual do sémen à criopreservação (Kuisma *et al.*, 2006; Loomis e Graham, 2008; Vidament *et al.*, 1997), por isso pretendemos também observar o efeito do Androcoll-E na sensibilidade dos ejaculados de garanhões à criopreservação.

Os estudos levados a cabo nesta tese foram delineados de forma a compreender a realidade das aplicações de técnicas de reprodução assistida, bem como melhorar o seu conhecimento e a sua aplicação tornando as mais eficazes.



Os objectivos científicos específicos deste estudo são investigar:

- 1- O efeito da actividade reprodutiva na microflora da genitália externa e sémen de garanhões, e a relação dos microorganismos presentes na pele com a genitália externa.
- 2- O efeito do tratamento com Androcoll-E na quantidade e qualidade de microorganismos presentes no sémen criopreservado de garanhão e o seu efeito nos parâmetros de cinética espermática pós-descongelção.
- 3- O efeito na taxa de gestação, patologia uterina e qualidade do embrião após cobrição natural e inseminação artificial com um garanhão portador de *Pseudomonas aeruginosa*.
- 4- As características dos espermatozóides da cauda do epidídimo do garanhão à recolha e efeito de dois protocolos de refrigeração na qualidade espermática pós-descongelção.
- 5- A presença ou ausência de microorganismos na cauda do epidídimo de garanhões saudáveis.

**Referências Bibliográficas**

- Allen WR. 2005. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. *Reproduction in Domestic Animals*, **40**: 310-329.
- Althouse GC, Skaife J, Loomis P. 2010. Prevalence and types of contaminant bacteria in extended, chilled equine semen. *Animal Reproduction Science*, **121**: 224-225.
- Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL. 2005. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Animal Reproduction Science*, **89**: 105–113.
- Amann RP, Waberski D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, **81**: 5–17.
- Aurich J, Aurich C. 2006. Developments in european horse breeding and consequences for veterinarians in equine reproduction. *Reproduction of Domestic Animals*, **41**: 275–279.
- Aurich C, Spergser J. 2007. Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. *Theriogenology*, **67**: 912-918.
- Barbas JP, Mascarenhas RD. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*, **10**: 49–62.
- Barker CAV, Gandier JC. 1957. Pregnancy in a mare resulted from frozen epididymal spermatozoa. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*, **21**: 47-51.
- Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, Magistrini M. 2001. Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science*, **68**: 181-190.
- Battut I, Grandchamp des Raux A, Nicaise JL, Fieni F, Tainturier D, Bruyas JF. 2000. When do equine embryos enter the uterine cavity? An attempt to answer. *Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Havemeyer Foundation Monograph Series 3*, pp: 60–61
- Bielansky A, Vajta G. 2009. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Human Reproduction*, **24**: 2457–2467.

- Blomqvist G, Persson M, Wallgren M, Wallgren P, Morrell JM. 2011. Removal of virus from boar semen spiked with porcine circovirus type 2. *Animal Reproduction Science*, **126**: 108–114.
- Bowen JM. 1969. Artificial insemination in the horse. *Equine Veterinary Journal*, **1**: 98–110.
- Bowen Y, Tobin N, Simpson RB, Ley WB, Ansani MM. 1982. Effects of washing on the bacterial flora of the stallion's penis. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, **32**: 41-45.
- Brinsko SP. 2011. Semen collection techniques and insemination procedures. In: *Equine Reproduction*, McKinnon, A.O., Squires E.L., Vaala W.E., Varner DD. (Ed.), Wiley-Blackwell, pp: 1268-1277.
- Bristol F. 1991. Bacterial flora of the reproductive tract in stallions. *Society Theriogenology Annual Meeting, San Diego*, pp:171–173.
- Brito L. 2007. Evaluation of stallion sperm morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice*, **6**: 249-264.
- Bruemmer JE. 2006. Collection and freezing of epididymal stallion sperm. *Veterinary Clinic of North America Equine Practice*, **3**: 677-682.
- Bruemmer JE, Reger H, Zibinski EL, Squires EL. 2002. Effect of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, **58**: 405-407.
- Card CE, Manning ST, Bowman P, Leibel T. 1997. Pregnancies from imipramine and xylazine-induced ex-copula ejaculation in a disabled stallion. *The Canadian Veterinary Journal*, **38**: 171-174.
- Cary JA, Madill S, Farnsworth K. 2004. A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. *The Canadian Veterinary Journal*, **45**: 35-41.
- Colenbrander B, Gadella BM, Stout TA. 2003. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, **38**: 305-311.
- Contri A., Valorz C., Faustini M., Wegher L., Carluccio A. 2010. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology*, **74**: 424-435.
- Davis R, Katz D. 1993. Operational standards for CASA instruments. *Journal of Andrology*, **14**: 385-394.

- Department of Economics Swedish University of Agricultural Sciences. 2001. The Horse Industry in the European Union. *Proceedings of EU Equus*, Skara e Slovalla.
- Dorado J, Gálvez MJ, Morrell JM, Alcaráz L, Hidalgo M. 2013. Use of single-layer centrifugation with Androcoll-C to enhance sperm quality in frozen-thawed dog semen. *Theriogenology*, **80**: 955–962.
- Eichelberger AC, Troedsson MH, Pozor MA, Macpherson ML. 2007. How to collect, handle, and process post-mortem epididymal sperm for breeding or assisted reproductive techniques. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*, Orlando, **53**: 583-586.
- Foote RH. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Science*, **80**: 1-10.
- Ford TC, Graham JM. 1991. Introduction to centrifugation techniques. In: *An introduction to centrifugation*. 1st (ed). BIOS Scientific Publishers Limited. Oxford: pp: 8.
- Frontoso R, De Carlo E, Pasolini MP, Van der Meulen K, Pagnini U, Iovane G, De Martino L. 2008. Retrospective study of bacterial isolates and their microbial susceptibilities in equine uteri during fertility problems. *Veterinary Science*, **84**: 1-6.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *Journal of Andrology*, **11**: 73-88.
- Hinrichs K, Choy YH. 2005. Assisted reproductive techniques in the Horse. *Clinical Techniques in Equine Practice*, **4**: 210-218.
- Hoogewijs M, Morrell J, Van Soom A, Govaere J, Johannisson A, Piepers S, De Schauwer C, De Kruif A, De Vliegher S. 2011. Sperm selection using single layer centrifugation prior to cryopreservation can increase thawed sperm quality in stallions. *Equine Veterinary Journal*, **43**: 35-41.
- Hughes J, Loy R, 1975: The relation of infection to infertility in the mare and stallion. *Equine Veterinary Journal*, **7**: 155-159.
- James AN, Green H, Hoffman S, Landry AM, Paccamonti D, Godke RA. 2002. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4 °C for 24, 48, 72 and 96 h. *Theriogenology*, **58**: 401–404.
- Johannisson A, Morrell JM, Thorén J, Jönsson M, Dalin A-M, Rodriguez-Martinez H. 2009. Colloidal centrifugation with Androcoll-E™ prolongs stallion sperm

- motility, viability and chromatin integrity. *Animal Reproduction Science*, **116**: 119-128.
- Katila T. 2001. *In vitro* evaluation of frozen-thawed stallion semen: a review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **42**: 199-217.
- Kuisma P, Andersson M, Koskinen E, Katila T. 2006. Fertility of frozen thawed stallion semen cannot be predicted by the current used laboratory methods. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **48**: 14-21.
- Lenz RW, Kjelland ME, VonderHaar K, Swannack TM, Moreno JF. 2011. A comparison of bovine seminal quality assessments using different viewing chambers with a computer-assisted semen analyzer. *Journal of Animal Science*, **89**: 383-388.
- Loomis PR, Graham JK. 2008. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*, **105**: 119-128.
- Love CC. 1992. Semen collection techniques. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, **8**: 111-128.
- Lu KG, Morressey PR. 2006. Reproductive tract infections in horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, **22**: 519-552.
- Madsen M, Christensen P. 1995. Bacterial flora of semen collected from Danish Warmblood stallions by artificial vagina. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **36**: 1-7.
- Malmgren L, Engvall EO, Engvall A, Albiñ A. 1998. Aerobic bacterial flora of semen and stallion reproductive tract and its relation to fertility under field conditions. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **39**: 173-182.
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*, **247**: 125-142.
- McCue PM, DeLuca CA, Ferris RA, Wall JJ. 2009. How to evaluate equine embryos. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*, Las Vegas, **55**: 252-255.
- McDonnell SM. 2001. Oral imipramine and intravenous xylazine for pharmacologically-induced ex-copula ejaculation in stallions. *Animal Reproduction Science*, **68**: 153-9.

- McDonnell SM, Garcia MC, Kenney RM, Van Arsdalen KN. 1987. Imipramine-induced erection, masturbation, and ejaculation in male horses. *Pharmacology Biochemistry Behaviour*, **27**: 187-191.
- Melo C, Zahn F, Martin I, Orlandi C, Dell'Aqua Jr F, Alvarenga MA, Papa FO. 2007. Influence of semen storage and cryoprotectant on post-thawed viability and fertility of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, **27**: 171-175.
- Morrell JM, Dalin AM, Rodriguez-Martinez H. 2008a. Comparison of density gradient and single layer centrifugation of stallion spermatozoa: yield, motility and survival. *Equine Veterinary Journal*, **41**: 53-58.
- Morrell, J.M., Dalin, A.M., Rodriguez-Martinez, H. 2008b. Prolongation of stallion sperm survival by centrifugation through coated silica colloids: a preliminary study. *Animal Reproduction*, **5** (3/4): 121-126.
- Morrell JM, Geraghty RJ. 2006. Effective removal of equine arteritis virus from stallion semen. *Equine Veterinary Journal*, **38**: 224-229.
- Morrell J.M., Johannisson A., Dalin A.-M., Rodriguez-Martinez H. 2009. Single-layer centrifugation with Androcoll-E can be scaled up to allow large volumes of stallion ejaculate to be processed easily. *Theriogenology*, **72**: 879-884.
- Morrell JM, Rodriguez-Martinez H. 2009. Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review. *The Open Andrology Journal*, **1**: 1-9.
- Morrell JM, Timoney P, Klein C, Shuck K, Campos J, Troedsson M. 2013. Single-Layer Centrifugation Reduces Equine Arteritis Virus Titre in the Semen of Shedding Stallions. *Reproduction in Domestic Animals*, **48**: 604–612.
- Morrell JM, Wallgren M. 2011. Removal of bacteria from boar ejaculates by Single Layer Centrifugation can reduce the use of antibiotics in semen extenders. *Animal Reproduction Science*, **123**: 64–69.
- Morris LHA, Tiplady CA, Allen WR. 2001. Hysteroscopic insemination of mares with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Havemeyer Foundation Monography Series*, **6**: 38-40.
- Mortimer D. 2000. Sperm Preparation Methods. *Journal of Andrology*, **21**: 357-366.

- Muradás PR, Weiss RR, Kozicki, LE, Granemann LC, Santos IW, Pimpão CT. 2006. Some viability parameters from equine spermatozoa harvested by artificial vagina and epididymal tail washing. *Archives of Veterinary Science*, **11**:69-74.
- Neild D, Miragaya M, Chaves G, Pinto M, Alonso A, Gambarotta M, Losinno L, Agüero A. 2006. Cryopreservation of cauda epididymis spermatozoa from slaughterhouse testicles 24h after ground transportation. *Animal Reproduction Science*, **94**: 92-95.
- Oldenhof H, Friedel K, Akhoondi M, Gojowsky M, Wolkers WF, Sieme H. 2012. Membrane phase behavior during cooling of stallion sperm and its correlation with freezability. *Molecular Membrane Biology*, **29**: 95–106.
- Papa FO, Melo CM, Fioratti EG, Dell' Aqua Jr JA, Zahn FS, Alvarenga MA. 2008. Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*, **107**: 293-301.
- Pertoft H. 2000. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **44**: 1–30.
- Pickett BW. 1993. Collection and evaluation of stallion semen for artificial insemination. In: *Equine Reproduction*, McKinnon AO, Voss JL (Ed.), Williams & Wilkins, pp: 705-14.
- Price S, Aurich J, Davies-Morel M, Aurich C. 2008. Effects of oxygen exposure and gentamicin on stallion semen stored at 4 and 15°C. *Reproduction in Domestic Animals*, **43**: 261-266.
- Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, de Kruif A. 2002. Use of the Sperm Quality Analyzer (SQA II-C) for the assessment of dog sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*, **37**: 158–163.
- Rocha A, Atayde L, Guimarães T, McDonnell S. 2008. Use of high temperature and penis manipulation in a stallion unresponsive to standard artificial vaginas: a Case Report. *Proceedings IV Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias*, pp: 123.
- Rota A, Calicchio E, Nardoni S, Fratini F, Ebani VV, Sgorbini M, Panzani D, Camillo F, Mancianti F. 2011. Presence and distribution of fungi and bacteria in the reproductive tract of healthy stallions. *Theriogenology*, **76**: 464–470.

- Samper J, Tibary A. 2006: Disease transmission in horses. *Theriogenology*, **66**: 551-559.
- Sieme H, Harrison RAP, Petrunkina AM. 2008. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Animal Reproduction Science*, **107**: 276–292.
- Somfai T, Bodó S, Nagy S, Papp AB, Iváncsics J, Baranyai B, Gócza E, Kovács A. 2002. Effect of Swim up and Percoll Treatment on viability and acrosome integrity of frozen–thawed bull spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, **37**: 285–290.
- Squires EL, Carnevale EM, McCue PM, Bruemmer JE. 2003. Embryo technologies in the horse. *Theriogenology*, **59**: 151-170.
- Stover J, Seager SWJ, Dolensk EP, Doherty J, Wildt DF, Platz CC. 1981. Electroejaculation and semen evaluation of the Przewalsky horse. *American Association Zoo Veterinarians*, **12**: 144-145.
- Stroud B. 2011. The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic animals. *IETS 2011 Statistic and Data Retrieval Committee Report*.
- Szóstek AZ, Siemieniuch MJ, Lukasik K, Galvão AM, Ferreira-Dias GM, Skarzynski DJ. 2012. mRNA transcription of prostaglandin synthases and their products in the equine endometrium in the course of fibrosis. *Theriogenology*, **78**: 768-76.
- Timoney PJ. 2010. Contagious equine metritis: An insidious threat to the horse breeding industry in the United States. *Journal of Animal Science*, **89**: 1552–1560.
- Varner DD, Love CC, Blanchard TL, Bliss SB, Carroll BS, Macpherson ML. 2010. Breeding-management strategies and semen- handling techniques for stallions—case scenarios. *Annual Convention of the AAEP*, Baltimore, **56**: 215-226.
- Varner DD, Scanlan CM, Thompson JA, Brumbaugh GW, Blanchard TL, Carlton CM, Johnson L. 1998. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. *Theriogenology*, **50**: 559-573.
- Vidament M, Duperq AM, Julienne P, Evain A, Noue P, Palmer E. 1997. Equine frozen semen, freezability and fertility field results. *Theriogenology*, **48**: 907-917.



Warmuth V, Eriksson A, Bower MA, Barker G, Barrett E, Hanks BK, Li S, Lomitashvili D, Ochir-Goryaeva M, Sizonov VG, Soyonov V, Manica A. 2012. Reconstructing the origin and spread of horse domestication in the Eurasian steppe. *PNAS*, **109**: 8202–8206.

# **Capítulo 1:** Effect of breeding activity on the microflora of the external genitalia and in the semen of stallions, and the relationship between microorganisms on the skin and on the external genitalia

(Submetido para publicação. Autores: Guimarães T, Miranda C, Pinto M, Silva E, Damásio L, Costa AL, Correia MJ, Duarte JC, Cosinha C, Lopes G, Thompson G, Rocha A)

## **Summary**

The external genitalia (EG) and semen of stallions harbour a wide variety of microorganisms. Type of bacteria found can be affected by the environment but the possible role of breeding activities in the composition of the genitalia's bacterial population has not been investigated. Also, the relationship between microorganisms colonizing the skin of the abdomen and the microbial population of the EG have not been ascertained. In experiment 1 we found that a higher number of species, including several considered to be potentially pathogenic, was isolated from breeding stallions (BST) than from non-breeding stallions (NBST). In experiment 2, BST were utilized to assess microbial content of the EG and semen. Almost all microorganisms isolated from swabs of the EG were present in the semen, albeit with a lower prevalence. In experiment 3 a higher number of microorganism species was isolated from the EG, than from the skin of the ventral abdomen in contact with the penis or from the skin of the thorax. With the sole exception of *E. coli*, potentially pathogenic bacteria were only isolated from the EG but not from the skin. Globally, results suggest that breeding activity increased the number of species of bacteria colonizing the EG and may have increased the number of pathogenic species; most species isolated from the EG were also found in semen even if at a lower frequency, and additional semen contamination seemed to occur during its manipulation. Many microorganism species of the skin were also isolated from the penis. However, independently of being or not in contact with the penis, skin did not seem to provide an adequate environment for the growth of potentially pathogenic bacteria that were isolated from EG, with the sole exception for *E. coli*.

**Keywords:** bacteria, semen, external genitalia, stallion.

## Introduction

The external genitalia of stallions harbour a wide variety of non-pathogenic (Bristol 1991; Malmgren *et al.*, 1998; Rota *et al.*, 2011) and potentially pathogenic microorganisms (Bowen *et al.*, 1982; Hughes and Loy 1975; Varner *et al.*, 1998). The bacterial species isolated from the external genitalia have been described in multiple studies, but data on the prevalence of individual species are scarce (Bristol 1991; Cerny *et al.*, 2012; Malmgren *et al.*, 1998; Rota *et al.*, 2011). Type of bacteria isolated can be affected by the environment (Malmgren *et al.*, 1998; Samper and Tibary 2006), and no study addressed the effect of breeding activity on species of bacteria isolated from the genitalia. These variables and gaps of information make it difficult to determine the clinical significance of bacteriological findings isolated from semen and external genitalia of stallions. Semen collected using an artificial vagina also contains microorganisms (Corona *et al.*, 2006; Madsen and Christensen 1995), however not all microorganisms found on the external genitalia were also isolated in the fresh semen (Guimarães *et al.*, 2011; Malmgren *et al.*, 1998).

McDonnell and Hynze (2005) described regular spontaneous erections in the stallion that bring the penis into contact with the abdomen. Therefore, microorganisms from the penis may be transported to the abdomen (creating a reservoir), and vice versa. To the authors' knowledge, no study has been carried out to compare the type of bacteria present in the external genitalia and in the abdominal skin.

The aims of the present work were to: a) determine the prevalence of the different species of microorganisms present in the external genitalia of breeding and non-breeding stallions; b) compare the microflora of the external genitalia and of the semen in the same stallions; and c) to investigate the relationship between type of bacteria found in the penis and type of bacteria found in the skin of the ventral paramedian abdominal wall (in regular contact with the penis) and in the skin of the rib cage (without any contact with the penis).

## **Material and methods**

### **Experiment 1**

Microbiological samples of the external genitalia were collected from a total of 59 healthy stallions (aged from 4 to 22 years) of eleven different breeds that had no evidence of reproductive tract pathology. All stallions were stabled in individual box stalls that were bedded with either straw or wood shavings. Stallions (n=41) that had been used for semen collection and for natural mating were classified as breeders (BST). Breeder stallions were kept in 1 of 4 different breeding facilities and in 1 of 3 different equestrian centres. Stallions that had no history of semen collection (n=18) or of having been used for breeding were classified as non-breeders (NBST) and were kept in one of the same 3 equestrian centres. The total number of stallions used in the experiment (BST + NBST) was designated as stallion general population (ST; n=59).

External genitalia bacteriologic samples were obtained by swabbing the urethra, urethral fossa and prepuce with a sterile swab, without previously washing the penis. Samples were collected in an erect penis after stimulating the stallion with a mare. The operator wore new, disposable latex gloves for each sample collection. Samples were then placed in a sterile tube (Sigma-Aldrich Química S.L., Portugal) without media and transported in a cooled semen transport box and processed in a microbiology laboratory within 24 h of collection.

Sample collections took place between February 2010 and June 2012.

### **Experiment 2**

Twenty three clinically healthy breeding stallions (BST) of eight different breeds, with no evidence of reproductive tract pathology and aged between 6 and 20 years were used in experiment 2. These stallions were kept in individual boxes with bedding of straw or wood shavings, in three different centres, during the breeding season of 2011 and 2012. External genitalia samples (EG) were collected before ejaculation, as previously described in experiment 1. Semen was collected using an artificial vagina (in most cases using a Missouri or an INRA

model), utilizing either a mare in estrus or a breeding phantom as a mount. A new internal liner or a different artificial vagina was utilized for each collection.

Immediately after semen collection, an aliquot of fresh, undiluted semen (S) was stored in a sterile 2 mL micro-centrifuge tube and transported in a cooled semen transport box for processing in a microbiology laboratory within 24 h. Operators collecting samples wore disposable latex gloves, renewed between collections.

### **Experiment 3**

Thirty two clinically healthy stallions of six different breeds, with no evidence of reproductive tract pathology and aged between 4 and 22 years, were used in this experiment. The stallions were kept in 9 different locations: 4 breeding centres and 5 equestrian schools. Samples were collected during the breeding season of 2011 and 2012. All stallions were kept in individual boxes with bedding of straw or wood shavings. Three different sterile swabs were utilized to collect samples from 3 different anatomical sites. The sites were the external genitalia (urethra/urethral fossa/prepuce, all collected with the same swab), the abdomen (one swab) and the ribcage (one swab). New, disposable latex gloves were used by the operator for each anatomical site swabbed.

The external genitalia samples (EG) were collected as described in Experiment 1. Abdomen samples (A) were collected swabbing the skin of the ventral paramedian area of the abdomen, where the erect penis contacts with the ventral abdomen. Ribcage samples (R) were collected swabbing the skin in the proximal lateral area of the 9<sup>th</sup> rib. All samples were transported in a cooled semen transport box and processed in a microbiology laboratory within 24 h of collection.

### **Microbial and fungal isolations**

The swabs collected from external genitalia and skin of different anatomical sites, were diluted in 1 mL of PBS. All samples (semen and swabs) were then mixed by pulse-vortexing, to yield a homogeneous solution. A full loop (10 µl) from each sample was streaked onto Columbia agar supplemented with 5% sheep blood (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), MacConkey agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and Sabouraud glucose agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)

plates for microbial growth. The plates were incubated under aerobic conditions at 37°C for 48 h. Morphological characteristics of recovered isolates were studied and biochemical characterization and species identification performed using IMViC (indole, methyl red, Voges-Proskauer, and citrate), triple sugar iron agar, nitrate reduction; urease, and catalase tests as previously described (Cappuccino and Sherman 1992) and/or API identification system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) according to the manufacturer's instructions. Frequency of isolation of a given microorganism species, expressed as a percentage of the total isolations, was calculated as the number of isolations of a given species, divided by total number of samples collected, times 100.

## Results

### Experiment 1

The frequency of isolation for each microorganism in the stallion general population (ST), breeder stallions (BST) and non-breeder stallions (NBST) is presented in Table 1. Each sample collected resulted in the growth of a mixed microorganism population of 2 to 9 different genera. In the BST and NBST groups, 27 and 15 different microorganisms were isolated, respectively. This resulted in 31 different microorganisms being isolated in the general population (ST). The potentially pathogenic bacteria (*Staph. aureus*, *Strep. zooepidemicus*, *K. pneumoniae*, *Ps. aeruginosa* and *E. coli*) (Frontoso *et al.*, 2008; Malmgren *et al.*, 1998), and bacteria with potentially deleterious effects on semen characteristics (*Strep. dysgalactiae equisimilis* and *Ps. aeruginosa*) (Aurich and Spargser 2006) were only isolated from BST stallions, whereas *E. coli* and *Strep. dysgalactiae equisimilis* were also found in NBST stallions.

Yeasts, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* coagulase-negative, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Bacillus* spp. and *Acinetobacter* spp. were isolated in more than 10% of the cases for stallions in all three groups (ST, BST and NBST). There were 11 species of microorganisms common to both BST and NBST groups, 16 species were exclusive to the BST group and 4 species exclusive to the NBST group (Table 1).

**Table 1.** Frequency (%) and number of isolations (isolated/total sampled) of microorganism obtained from swabbing the external genitalia of all stallions (ST), stallions used for natural service and/or semen collection (BST) and of non-breeding stallions (NBST).

Microorganisms	Frequency of isolation in ST % (n-59)	Frequency of isolation in BST % (n-41)	Frequency of isolation in NBST % (n-18)
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.4 (2/59)	4.9 (2/41)	0.0 (0/18)
<i>Streptococcus equi zooepidemicus</i>	1.7 (1/59)	2.4 (1/41)	0.0 (0/18)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4.7 (3/59)	7.3 (3/41)	0.0 (0/18)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7.8 (5/59)	12.2 (5/41)	0.0 (0/18)
<i>Escherichia coli</i>	18.8 (12/59)	19.5 (8/41)	22.2 (4/18)
<i>Streptococcus dysgalactiae equisimilis</i>	3.4 (2/59)	2.4 (1/41)	5.6 (1/18)
<i>Staphylococcus coagulase-negative</i>	61.0 (36/59)	65.9 (27/41)	50.0 (9/18)
<i>Staphylococcus intermedius</i>	1.7 (1/59)	2.4 (1/41)	0.0 (0/18)
<i>Streptococcus α-haemolytic</i>	4.7 (3/59)	7.3 (3/41)	0.0 (0/18)
<i>Enterococcus faecalis</i>	26.6 (17/59)	36.6 (15/41)	11.1 (2/18)
<i>Enterococcus spp.</i>	4.7 (3/59)	7.3 (3/41)	0.0 (0/18)
<i>Micrococcus spp.</i>	1.7 (1/59)	2.4 (1/41)	0.0 (0/18)
<i>Corynebacterium spp.</i>	71.9 (45/59)	87.8 (36/41)	50.0 (9/18)
<i>Aerococcus viridians 3</i>	3.4 (2/59)	2.4 (1/41)	5.6 (1/18)
<i>Acinetobacter spp.</i>	15.6 (10/59)	19.5 (8/41)	11.1 (2/18)
<i>Bacillus spp.</i>	17.2 (11/59)	14.6 (6/41)	27.8 (5/18)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	6.3 (4/59)	9.8 (4/41)	0.0 (0/18)
<i>Enterobacter agglomerans</i>	1.7 (1/59)	0.0 (0/41)	5.6 (1/18)
Others <i>Enterobacter spp.</i>	4.7 (3/59)	4.9 (2/41)	5.6 (1/18)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.7 (1/59)	2.4 (1/41)	0.0 (0/18)
<i>Proteus mirabilis</i>	1.7 (1/59)	2.4 (1/41)	0.0 (0/18)
<i>Moraxella spp.</i>	1.7 (1/59)	0.0 (0/41)	5.6 (1/18)
<i>Escherichia spp.</i>	1.7 (1/59)	2.4 (1/41)	0.0 (0/18)
<i>Salmonella spp.</i>	1.7 (1/59)	0.0 (0/41)	5.6 (1/18)
<i>Neisseria spp.</i>	1.7 (1/59)	2.4 (1/41)	0.0 (0/18)
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1.7 (1/59)	2.4 (1/41)	0.0 (0/18)
<i>Gardnerella vaginalis</i>	1.7 (1/59)	2.4 (1/41)	0.0 (0/18)
<i>Shigella spp.</i>	1.7 (1/59)	2.4 (1/41)	0.0 (0/18)
<i>Citrobacter spp.</i>	3.4 (2/59)	0.0 (0/41)	11.1 (2/18)
Filamentous fungi	4.7 (3/59)	2.4 (1/41)	11.1 (2/18)
Yeasts	79.7 (51/59)	82.9 (34/41)	94.4 (17/18)

## Experiment 2

The frequency of isolations for each microorganism on the external genitalia (EG) and semen (S) is presented in Table 2. Yeasts, *E. coli*, *Staphylococcus coagulase-negative*, *Corynebacterium spp.*, *Acinetobacter spp.* and *Bacillus spp.* were isolated in more than 15% of the samples in both the EG and S. A total of 22



and 20 different microorganism species was isolated in the EG and in S, respectively. There were 19 species common to both the EG and S, 3 species (*K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, and filamentous fungi) were only isolated from the EG and one specie (*Salmonella* spp.) was only isolated in the semen. In 7 stallions *Staphylococcus* coagulase-negative, *Corynebacterium* spp., *Acinetobacter* spp., yeasts, *Bacillus* spp., *Strep. zooepidemicus* and *Salmonella* spp. were isolated from the semen samples, but were not isolated from the corresponding EG samples.

**Table 2.** Frequency (%) and number of isolations (isolated/total sampled) of microorganism isolated from the external genitalia (EG) and fresh semen (S) of the same stallions.

Microorganisms	Frequency of isolation in EG (%) (n-23)	Frequency of isolation in S (%) (n-23)
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.3 (1/23)	4.3 (1/23)
<i>Streptococcus equi zooepidemicus</i>	4.3 (1/23)	8.7 (2/23)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4.3 (1/23)	0.0 (0/23)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13.0 (3/23)	4.3 (1/23)
<i>Escherichia coli</i>	17.4 (4/23)	17.4 (4/23)
<i>Streptococcus dysgalactiae equisimilis</i>	4.3 (1/23)	4.3 (1/23)
<i>Staphylococcus</i> coagulase-negative	65.2 (15/23)	60.9(14/23)
<i>Staphylococcus intermedius</i>	4.3 (1/23)	4.3 (1/23)
<i>Streptococcus</i> α-hemolytic	13.0 (3/23)	8.7 (2/23)
<i>Enterococcus faecalis</i>	43.5 (10/23)	8.7 (2/23)
<i>Enterococcus</i> spp.	13.0 (3/23)	8.7 (2/23)
<i>Micrococcus</i> spp.	4.3 (1/23)	4.3 (1/23)
<i>Corynebacterium</i> spp.	87.0 (20/23)	65.2 (15/23)
<i>Acinetobacter</i> spp.	26.1 (6/23)	34.8 (8/23)
<i>Bacillus</i> spp.	17.4 (4/23)	17.4 (4/23)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	8.7 (2/23)	8.7 (2/23)
Others <i>Enterobacter</i> spp.	8.7 (2/23)	13.0 (3/23)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	8.7 (2/23)	4.3 (1/23)
<i>Proteus mirabilis</i>	4.3 (1/23)	0.0 (0/23)
<i>Salmonella</i> spp.	0.0 (0/23)	4.3 (1/23)
<i>Shigella</i> spp.	4.3 (1/23)	4.3 (1/23)
Filamentous fungi	4.3 (1/23)	0.0 (0/23)
Yeasts	87.0 (20/23)	91.3 (21/23)

### Experiment 3

The number and frequency of isolations of microorganisms on the external genitalia (EG), ventral paramedian abdominal wall (A) and ribcage (R) are presented in Table 3. All samples collected resulted in the growth of a mixed microorganism population, of 2 to 9 different genera. A total of 23, 14 and 12 different microorganism species was isolated in the EG, A and R sampling groups, respectively. There were 11 species common to both EG and A and 10 species common to both A and R. Twelve microorganism species (including *Staph. aureus*, *K. pneumoniae*, *Ps. aeruginosa* and *Strep. dysgalactiae equisimilis*) were only isolated from the EG and 3 species (*Streptococcus* alpha hemolytic, *Citrobacter* spp. and *Actinomyces* spp.) were only isolated from the A samples. When comparing microorganism growth between the two non-genital sites (A and R), it was found that 3 non-pathogenic species (*Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella oxytoca* and *Citrobacter* spp.) were only isolated from the A group, while 2 non-pathogenic bacteria were isolated only from the R group (*Aerococcus viridians* 3, *Bacillus mycoides*). Yeasts, *Staphylococcus* coagulase-negative, *Enterococcus faecalis*, and *Bacillus* spp. had a frequency of isolation above 30% on both the abdomen (A) and on the rib cage (R).

**Table 3.** Frequency (%) and number of isolations (isolated/total sampled) of microorganism isolated from the external genitalia (EG), skin of the ventral abdomen (A) and skin of the ribcage (R).

Microorganisms	Frequency of isolation in EG % (n-31)	Frequency of isolation in A % (n-31)	Frequency of isolation in R % (n-31)
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.2 (1/31)	0.0 (0/31)	0.0 (0/31)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9.7 (3/31)	0 (0/31)	0.0 (0/31)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16.1 (5/31)	0.0 (0/31)	0.0 (0/31)
<i>Escherichia coli</i>	19.4 (6/31)	22.6 (7/31)	6.5 (2/31)
<i>Streptococcus dysgalactiae equisimilis</i>	3.2 (1/31)	0.0 (0/31)	0.0 (0/31)
<i>Staphylococcus coagulase-negative</i>	71.0 (22/31)	87.1 (27/31)	87.1 (27/31)
<i>Staphylococcus intermedius</i>	3.2 (1/31)	0.0 (0/31)	0.0 (0/31)
<i>Streptococcus α-hemolytic</i>	0.0 (0/31)	16.1 (5/31)	9.7 (3/31)
<i>Enterococcus faecalis</i>	45.2 (14/31)	54.8 (17/31)	54.8 (17/31)
<i>Enterococcus</i> spp.	3.2 (1/31)	0.0 (0/31)	0.0 (0/31)
<i>Micrococcus</i> spp.	3.2 (1/31)	0.0 (0/31)	0.0 (0/31)
<i>Corynebacterium</i> spp.	87.1 (27/31)	3.2 (1/31)	3.2 (1/31)
<i>Aerococcus viridians</i> 3	3.2 (1/31)	0.0 (0/31)	3.2 (1/31)
<i>Acinetobacter</i> spp.	16.1 (5/31)	3.2 (1/31)	3.2 (1/31)
<i>Bacillus mycoides</i>	0.0 (0/31)	0.0 (0/31)	3.2 (1/31)
<i>Bacillus</i> spp.	16.1 (5/31)	35.5 (11/31)	32.3 (10/31)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	9.7 (3/31)	0.0 (0/31)	0.0 (0/31)
<i>Enterobacter agglomerans</i>	3.2 (1/31)	3.2 (1/31)	0.0 (0/31)
Other <i>Enterobacter</i> spp.	3.2 (1/31)	0.0 (0/31)	0.0 (0/31)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3.2 (1/31)	3.2 (1/31)	0.0 (0/31)
<i>Escherichia</i> spp.	3.2 (1/31)	9.7 (3/31)	3.2 (1/31)
<i>Alcaligenes faecalis</i>	3.2 (1/31)	0.0 (0/31)	0.0 (0/31)
<i>Gardnerella vaginalis</i>	3.2 (1/31)	0.0 (0/31)	0.0 (0/31)
<i>Citrobacter</i> spp.	0.0 (0/31)	3.2 (1/31)	0.0 (0/31)
<i>Actinomyces</i> spp.	0.0 (0/31)	3.2 (1/31)	0.0 (0/31)
Filamentous fungi	9.7 (3/31)	16.1 (5/31)	16.1 (5/31)
Yeasts	93.5 (29/31)	93.5 (29/31)	93.5 (29/31)

## Discussion

Data on the frequency of isolation of the different species of microorganisms of the external genitalia of healthy stallions are scarce, and type of microorganisms isolated varies between studies (Bowen *et al.*, 1982; Bristol 1991; Hughes and Loy 1975; Malmgren *et al.*, 1998; Varner *et al.*, 1998).

In experiment 1 of the present study, yeasts were the microorganism most frequently isolated (79.7%) in all stallions (ST group), independently of them being used or not for natural mating or as semen donors. This frequency of isolation of yeasts is higher than the 24.2% isolated from the urethral fossa in eleven stallions

(Rota *et al.*, 2011). Other authors reported isolation of *Aspergillus fumigatus* (Bristol, 1991) and *Mucor* spp. (Malmgren *et al.*, 1998) without quantifying frequency of isolation. The high incidence of yeasts isolated in experiment 1 was corroborated by similar high frequencies of isolation in horses stabled at other locations and used for experiments 2 (87.0%) and 3 (93.5%).

In experiments 2 and 3 there was a very high prevalence of yeasts isolated not only on the EG, but also in the semen and on the skin of the abdomen (A) and ribcage (R). This higher incidence of yeasts isolation in comparison to the study by Rota *et al.*, (2011) may have been due to heavy environmental contamination, in which case it would be common across locations, and/or differences between laboratory isolation protocols (Malmgren *et al.*, 1998).

The bacteria most frequently isolated on the EG of the general population of stallions (ST) was *Corynebacterium* spp. (71.9%) and *Staphylococcus* coagulase-negative (61.0%), both of which are commonly found on the skin (Madsen and Christensen 1995; Zubrod *et al.*, 2004). These findings are in agreement with previous results (Bristol, 1991). *Ps. aeruginosa* and *K. pneumoniae* were isolated in low frequencies (7.8%, 4.7% respectively) in the ST group. Frequencies of isolation for these bacteria by other authors vary: Hughes and Loy (1975) found *Ps. aeruginosa* in 36% of the samples, but no *Klebsiella pneumoniae* was isolated; Malmgren *et al.*, (1998) reported 12.5% of *Ps. aeruginosa* and 6.3% of *K. pneumonia*, while Rota *et al.*, (2011) did not isolate either bacterium. To our best knowledge we report for the first time the frequency of isolation of *Staph. aureus* (3.4%). The importance of this bacterium it is not only it being isolated in many cases of endometritis, but also its zoonotical potential.

*Strep. zooepidemicus* is considered to be a pathogenic agent in the horse (Samper and Tibary 2006) and is one of the main bacterium isolated from mares with endometritis (Cerny *et al.*, 2012; Frontoso *et al.*, 2008) however reports of its prevalence in the genitalia of stallions are scarce. The prevalence of *Strep. zooepidemicus* in the EG of BST in the current study was not high, a mere 2.4%. Cerny *et al.*, (2012) obtained 23 positive isolations for this bacterium out of 201 swabbings of the distal urethra, after natural services performed by 15 stallions. Given its pathogenic potential, additional studies on the prevalence of this bacterium are warranted.

Yeasts, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* coagulase-negative, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Bacillus* spp. and *Acinetobacter* spp. were isolated in more than 10% of all stallions independently of their breeding activity (Table 1), which suggests that it represents a microflora common to all stallions in the studied locations.

It is worth noting that 27 species of microorganisms were isolated in BST versus only 15 species in NBST. This difference may probably be due to several factors: stallions used for breeding and as semen donors can be contaminated during services or semen collection procedures, and these stallions were often handled in multiple locations, with a diversity of sanitary conditions. Breeding stallions included in the study were actively utilized in sports events and/or shows which may have subjected them to a highly diverse population of environmental bacteria. On the other hand NBST were utilized for amateur equestrian classes and leisure riding in a single equestrian centre, and thus may have been exposed to a homogeneous bacterial population.

A group of potentially pathogenic bacteria, *Ps. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Strep. zooepidemicus* and *Staph. aureus* were exclusively found in BST. The environment is considered to be the source of *Ps. aeruginosa* and *K. pneumoniae* (Malmgren *et al.*, 1998) and *Strep. zooepidemicus* is thought to be a mucosal commensal of the respiratory tract of horses (Erol *et al.*, 2012). Thus, these three bacteria species might have been expected to be present in the external genitalia of both BST and NBST, especially considering that many of the horses in both groups had at times been stationed in the same equestrian centres, often sharing the same handlers. The fact that the number of isolation for these bacteria were low in BST (1 to 5 isolations; Table 1) and that a lower number of NBST were sampled, could have contributed to its absence in the later. Conversely, Hinrichs *et al.*, (1988) isolated *Strep. zooepidemicus*, *Ps. aeruginosa* and *K. pneumoniae* from the clitoral fossa of healthy brood mares, and Cerny *et al.*, (2012) found that *Strep. zooepidemicus* was the bacterium with highest frequency of isolations both from the uterus of mares with endometritis (90.9% of the cases) and from stallions harbouring pathogenic bacteria after natural mating (51.1%). Thus, one may speculate that genital transmission of these bacteria could explain its isolation only in the BST group. Recently, Rasmussen *et al.*, (2013) demonstrated that *Strep. zooepidemicus* isolates from infectious endometritis are genetically different from

isolates from the cranial vagina and clitoral fossa. It would be of interest to compare the genetic strain of this species isolated from the stallion and from the mare.

Peterson *et al.*, (2012) reported that *Staph. aureus* was present only in nasal swabs of horses housed in contaminated environments and that it disappeared from both the environment and the nasal mucosa after eight weeks of the first isolation. These and other authors (Bergstrom *et al.*, 2012) considered that horses could be contaminated through interaction with human carriers, and Madsen and Christensen (1995) suggested that the handlers' hands may be a source of contamination of the external genitalia and semen. In our experiment only BST harboured *Staph. aureus*, so one may speculate that this may have been due to contamination after manipulation of the stallions' genitalia. However, its absence in NBST could be simply due to a smaller sample size.

We found a numerically higher percentage (5.6%) of NBST with *Strep. dysgalactiae equisimilis* in the EG than in BST stallions (2.4%), which does not support the hypothesis by Madsen and Christensen (1995), that most stallions became negative after withdrawal from natural mating and that the mare is the natural reservoir of *Strep. dysgalactiae equisimilis*.

In experiment 2, a mixed microorganism population was isolated from fresh semen collected with an artificial vagina, which is in agreement with previous results obtained elsewhere (Corona *et al.*, 2006; Madsen and Christensen 1995; Malmgren *et al.*, 1998; Rota *et al.*, 2011; Thibier and Guerin 2000). A very high incidence of yeasts, as already reported in experiment 1 for the external genitalia, was also seen in the semen. Yeast contamination is probably environmentally related. Some authors did not report yeasts in the semen even when present in the urethral fossa (Rota *et al.*, 2011) whereas others do, but without giving the prevalence of isolation (Malmgren *et al.*, 1998). Differences among studies may reflect dissimilar levels of environmental contamination and sanitary standards, as well as different microbiology laboratories procedures specific for the isolation of yeasts (Malmgren *et al.*, 1998). Also, fungal endometritis has a lower incidence (1 to 5%) than bacterial endometrites (Coutinho and Alvarenga, 2011). Possibly, in many studies no yeasts isolation was attempted, and thus the presence of these microorganisms may have been underestimated.

The bacteria with the highest frequencies of isolations in semen were *Staphylococcus* coagulase-negative (60.9%) and *Corynebacterium* spp. (65.2%), which is in agreement with previous results obtained by Madsen and Christensen (1995). No bacteria was found in the epididymis of healthy stallions (Guimarães *et al.*, 2013) and the presence of bacteria in the testes, epididymes and accessory sex glands is thought to represent a pathological condition (Rota *et al.*, 2011), with semen contamination occurring in healthy stallion only when the ejaculate enters in contact with the distal urethra/urethral fossa (Malmgren *et al.*, 1998). This is consistent with the findings of experiment 2, as the majority of microorganisms with an isolation frequency higher than 15% on the EG were also present in semen (yeasts, *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase-negative, *Corynebacterium* spp., *Acinetobacter* spp. and *Bacillus* spp.) with a similar number of species (22) isolated from the EG and from the ejaculates (20). Of the 19 species found both on the EG and in the S, 15 had an equal or lower frequency of isolation in the S samples compared to EG samples, indicating that at least on some occasions, microorganisms present on the EG did not pass to the ejaculate. Three species (*K. pneumoniae*, *P. mirabilis* and filamentous fungi) were found only on the EG and *Salmonella* spp. was isolated exclusively from semen.

In the present study bacteria considered to be pathogenic, such as *Staph. aureus*, *Strep. zooepidemicus*, *Ps. aeruginosa* and *E. coli* (Malmgren *et al.*, 1998; Frontoso *et al.*, 2008), as well as bacteria thought to be able to induce deleterious effects on chilled semen (Aurich and Spergser 2006), namely *Strep. dysgalactiae equisimilis* and *Ps. aeruginosa*, were present both on the EG and in the semen. This finding highlights the fact that despite induction of uterine disease being more likely to occur after natural mating than after artificial insemination (Samper and Tibary 2006), semen may still harbour the pathogenic bacteria colonizing the external genitalia. The experimental design of this study did not allow for the quantification of the bacterial concentration in the EG and in semen, but only its frequency of isolation.

In 7 stallions some microorganisms isolated from semen were not detected in the EG samples. These microorganisms comprised species generally considered non-pathogenic (*Staphylococcus* coagulase-negative, *Corynebacterium* spp., *Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp., yeasts, and *Bacillus* spp.), but also the potentially pathogenic *Strep. zooepidemicus* and

*Salmonella* spp. The occurrence of microorganisms in the semen that are absent from the EG suggests contamination during manipulations, as previously noted (Madsen and Christensen 1995; Samper and Tibary 2006).

The bacteria found on the ventral abdomen (A) and on the ribcage (R) in experiment 3 correspond to the microbial flora described for healthy skin of the horse (Zubrod *et al.*, 2004). The microorganism species and its frequency of isolation were similar between A and R, with the exception of *E. coli* that had a higher number of isolations in A (7/31) than in R (2/31), the former having a similar frequency of isolation as in the EG (6/31). This might be attributed to the fact that anatomical sites A and EG are much closer to the ground with its faecal contaminants, than site R. The possibility of penis contamination with *E. coli* through penis contact with the ventral abdomen during spontaneous erections or *vice versa*, cannot be discharged. No isolations of the potentially pathogenic *Staph. aureus*, *K. pneumoniae* and *Ps. aeruginosa*, and of *Strep. dysgalactiae equisimilis* were obtained from A and R, even in stallions that carried these bacteria in the EG, which suggests that healthy skin does not provide an adequate environment for those bacteria to grow. Therefore, cleaning the area of the ventral abdomen that contacts the erect penis should have limited value as means to avoid penis contamination with pathogenic bacteria, with the possible exception for *E. coli*. In relation to the importance of contamination with *E. coli*, one should keep in mind that, at least in cattle, not all *E. coli* strains induce uterine pathology (Sheldon *et al.*, 2010). Given these results, microorganism isolation from swabbing of the ventral abdomen would not be completely representative of the bacterial contamination of the external genitalia.

## **Conclusion**

A wide variety of microorganisms were found in the external genitalia of stallions, with some dissimilarities to previous reports (Bristol 1991; Corona *et al.*, 2006; Malmgren *et al.*, 1998; Rota *et al.*, 2011) in respect to type and frequency of isolation of the different species, which confirms the influence of location, management and laboratory technique on the isolation of the microflora of the external genitalia of stallions.



This study also compared for the first time the microflora of the external genitalia of breeding and non-breeding stallions, which differed, particularly in respect to total number of species isolated including potentially pathogenic bacteria which were found more often in breeding stallions.

The existence of bacteria in semen that was absent from the external genitalia suggests contamination by operator and highlights the need for strict sanitary conditions when collecting and manipulating semen.

Finally, by the first time type of microorganisms present on the external genitalia was compared with microorganisms of the ventral abdomen in contact with the erect penis and on an area of the skin without any possible direct contact with the penis. Several microorganism species were found on both the external genitalia and on the two skin sites. Important exceptions were the potentially pathogenic *Staph. aureus*, *Ps. aeruginosa* and *K. pneumoniae*, found only on the external genitalia, which suggests that cleaning of the abdomen would have limited value as means of avoiding contamination of the penis with pathogenic bacteria.

## **Acknowledgments**

This work was partially financed by Projects PTDC/CVT/108456/2008 (FCT) and COMPETE:FCOMP-01-0124-FEDER-009565 (FEDER). The authors gratefully acknowledge the revision of the manuscript by Dr. Bruce Eilts, School of Veterinary and Biomedical Sciences, Queensland, Australia.

## **References**

- Aurich C, Spergser J. 2006. Influence of genitally pathogenic bacteria and gentamicin on motility and membrane integrity of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, **94**, 117-120.
- Bergstrom K, Aspan A, Landen A, Johnston C, Gronlund-Andersson U. 2012. The first nosocomial outbreak of methicillin-resistan *Staphylococcus aureus* in horses in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **54**, 11.

- Bowen Y, Tobin N, Simpson RB, Ley WB, Ansani MM. 1982. Effects of washing on the bacterial flora of the stallion's penis. *Journal of Reproduction Fertility Supplement.*, **32**, 41-45.
- Bristol F. 1991. Bacterial flora of the reproductive tract in stallions. *Society of Theriogenology Annual Meeting*, San Diego, pp: 171–173.
- Cappuccino JG, Sherman N. 1992. Biochemical activities. In: Cappuccino JG, Sherman N (ed.), *Microbiology; A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> edition. Rockland Community College, Suffern, NY, USA, pp: 127-178.
- Cerny KL, Little CF, Scoggin RJ, Coleman MHT, Troedsson EL. 2012. Presence of bacteria in the reproductive tract of healthy stallions and its relation to the fertility of mares. *Proceedings of the Society for Theriogenology Annual Conference*, Baltimore, pp: 427.
- Corona A, Cossu I, Bertulu A, Cherchi R. 2006. Characterisation of bacteria in fresh semen of stallions during the breeding season. *Animal Reproduction Science*, **94**, 85-88.
- Coutinho da Silva MA, Alvarenga MA. 2011. Fungal Endometritis. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD (ed.), *Equine Reproduction*, 2<sup>nd</sup> edition. Wiley-Blackwell, pp: 2643-2651.
- Erol E, Locke S, Donahoe J, Mackin M, Carter C. 2012. Beta-hemolytic *Streptococcus* spp. from horses: a retrospective study (2000-2010). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **24**, 142-147.
- Frontoso R, De Carlo E, Pasolini MP, Van der Meulen K, Pagnini U, Iovane G, De Martino L. 2008. Retrospective study of bacterial isolates and their microbial susceptibilities in equine uteri during fertility problems. *Veterinary Science*, **84**, 1-6.
- Guimarães T, Carnevalheira C, Rocha A. 2011. Conception rate, uterine infection and embryo quality after artificial insemination and natural breeding with a stallion carrier of *Pseudomonas aeruginosa*: a case report. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **54**: 20-25.
- Guimarães T, Pinto M, Miranda C, Silva E, Lopes G, Fernandes A, Thompson G, Rocha A. 2013. Are there bacteria in the epididymis of healthy stallion? 13<sup>th</sup> WEVA Congress, Budapest.

- Hinrichs K, Cummings M, Sertich P, Kenney R. 1988. Clinical significance of aerobic bacterial flora of uterus, vagina, vestibule, and clitoral fossa of clinically normal mares. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, **193**: 72-75.
- Hughes J, Loy R. 1975. The relation of infection to infertility in the mare and stallion. *Equine Vet. J.*, **7**: 155-159.
- Madsen M, Christensen P. 1995. Bacterial flora of semen collected from Danish warm blood stallions by artificial vagina. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **36**: 1-7.
- Malmgren L, Olsson Engvall E, Engvall A, Albiñ A. 1998. Aerobic bacterial flora of semen and stallion reproductive tract and its relation to fertility under field conditions. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **39**: 173-182.
- McDonnell SM, Hynze AL. 2005. Aversive conditioning of periodic spontaneous erection adversely affects sexual behaviour and semen in stallions. *Animal Reproduction Science*, **89**: 77-92.
- Peterson A, Davis M, Awantang G, Limbago B, Fosheim G, Silbergeld EK. 2012. Correlation between animal nasal carriage and environmental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at U.S. horse and cattle farms. *Veterinary Microbiology*, **160**: 539-543.
- Rota A, Calicchio E, Nardoni S, Fratini F, Ebani VV, Sgorbini M, Panzani D, Camillo F, Mancianti F. 2011. Presence and distribution of fungi and bacteria in the reproductive tract of healthy stallions. *Theriogenology*, **76**: 464-470.
- Rasmussen CD, Haugaard MM, Petersen MR, Nielsen JM, Pedersen HG, Bojesen AM. 2013. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isolates from equine infectious endometritis belong to a distinct genetic group. *Veterinary Research*, **44**: 26-34.
- Samper J, Tibary A. 2006. Disease transmission in horses. *Theriogenology*, **66**: 551-559.
- Sheldon IM, Price SB, Gilbert RO, Simpson KW. 2010. Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. *PLOS One*, **5**: 91-92.
- Thibier M, Guérin B, 2000: Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, **62**: 233-251.

- Varner DD, Scanlan CM, Thompson JA, Brumbaugh GW, Blanchard TL, Carlton CM, Johnson L. 1998. The bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. *Theriogenology*, **50**: 559–573.
- Zubrod CJ, Farnsworth KD, Oaks JL. 2004. Evaluation of arthrocentesis site bacterial flora before and after 4 methods of preparation in horses with and without evidence of skin contamination. *Veterinary Surgery*, **33**: 525-530.

**Capítulo 2: Colloid centrifugation of fresh stallion semen prior to cryopreservation decreased microorganism load of froze-thawed semen without affecting seminal kinetics**

## Summary

The considerable variation in how stallion sperm survives freeze/thawing could be associated with microorganisms present in fresh and/or frozen thawed semen. The objective of this study was to verify the effect of single layer centrifugation (SLC) of fresh semen prior to cryopreservation, on semen's microbial load and sperm cells kinetics after freeze/thawing. For that, one ejaculate was collected from 20 healthy stallions, and split into control (C) samples (cryopreserved without previous SLC) and SLC samples (subjected to SLC). Semen cryopreservation was performed according to the same protocol in both groups. Microbial load (ML) of each microorganism, total microbial load (TML) and frozen/thawed sperm kinetics (total motility, curvilinear velocity, average path velocity, percentage of rapid sperm cells and straightness index) were assessed in both groups. Additional statistical analysis of the TML was performed, subdividing the frozen thawed samples in "suitable" (total motility  $\geq 30\%$ ) and "unsuitable" ( $< 30\%$ ) semen for freezing programmes, and comparing the C and SLC groups within these subpopulations. After thawing, SLC samples had less ( $p < 0.05$ ) total microbial load than C samples, with particular effect in the *Enterococcus* spp. and *Bacillus* spp. species ( $p < 0.05$ ). A relationship between post-thaw motility and SLC effect on microbial load was noted, as only in samples with more than 30% total motility was microbial load reduced by SLC. The effect of SLC on kinetics of frozen-thawed sperm cells was negligible.

**Keywords:** stallion, semen, cryopreservation, bacteria, Androcoll-E

## Introduction

Success in stallion semen cryopreservation is variable. It has been estimated that 20% of stallions produce semen that freezes well, 60% semen that freezes acceptably and 20% of the stallions have semen that freezes poorly (Kuisma *et al.*, 2006; Sieme *et al.*, 2008). The mechanisms underlying the differences in cryosensitivity between individuals are largely unknown (Sieme *et al.*, 2008). Those differences could be attributed to genetic factors (Allen, 2005; Sieme *et al.*, 2008), type of cryoprotectant used in the extender (Allen, 2005; Alvarenga *et al.*, 2005), and other non-genetic factors not yet elucidated (Sieme *et al.*, 2008).

Frozen-thawed semen contains bacteria (Corona and Cherchi, 2009; Najjar *et al.*, 2010; Ortega-Ferrusola *et al.*, 2008) and Hoogewijs *et al.* (2011) hypothesized that a reduction in bacterial contamination would improve the quality of frozen-thawed semen. Bacterial contamination is known to affect semen during cold storage (Aurich and Spergser, 2007) but a bacterial influence in the quality of frozen-thawed equine semen remains unproven.

Semen contaminated with bacteria can compromise the outcome of assisted reproductive techniques (ART) or promote infection of the female genital tract, in humans (Fourie *et al.*, 2011). In horses, it has been recognised that bacteria present in the stallion external genitalia and semen can be transmitted to mares after breeding activities (Guimarães *et al.*, 2011; Samper and Tibary, 2006) and may lead to uterine pathology and infertility especially in susceptible mares (Corona and Cherchi, 2009, Madsen and Christensen, 1995; Samper and Tibary, 2006). Consequently, antibiotics are routinely added to semen extenders (Morrell and Wallgreen, 2011) but some may have an adverse effect on sperm quality and in general are ineffective below 15°C (Aurich and Spergser, 2007). Additionally, even small concentrations of antibiotics can result in antibiotic resistance (Johansson *et al.*, 2004, Morrell *et al.*, 2014) and thus, the prophylactic utilization in semen extenders raises concerns.

Density gradient centrifugation effectively reduced bacterial contamination of semen in humans (Fourie *et al.*, 2011; Nicholsson *et al.*, 2000), and bacterial contamination in boar semen was decreased by a single layer centrifugation (SLC) using the species-specific colloid Androcoll-P (Morrell and Wallgren, 2011).

Recently, SLC through Androcoll-E greatly reduced the bacterial load in stallion semen “spiked” with known concentrations of specific microorganisms (Morrell *et al.*, 2014). Also, improvement of seminal characteristics of refrigerated stallions ejaculates (Costa *et al.*, 2012; Johannisson *et al.*, 2009) and frozen-thawed sperm (Macías García *et al.*, 2009; Stoll *et al.*, 2013) after SLC has been reported by several groups, and Hoogewijs *et al.* (2011) noted an overall increased sperm quality in some ejaculates of equine semen subjected to SLC prior to cryopreservation.

The objectives of this study were (a) to verify if SLC through Androcoll-E of fresh semen prior to cryopreservation decreased microbial content over non-SLC treated samples and; (b) to assess post-thaw semen kinetics characteristics of SLC treated and non-treated samples of the same ejaculates.

## **Material and methods**

### **Animals and Experimental Design**

During the breeding season (February to August) of 2012 and 2013 twenty healthy stallions of different breeds (12 Pure Breed Lusitano, 1 BWP, 2 Thoroughbreds, 1 French Saddle, 2 Sorraia and 2 Lusitano crossbreds) with ages ranging from five to twenty two years were used for semen collection (one ejaculate/stallion) and cryopreservation. All ejaculates used for the experiment had  $\geq 30\%$  progressive motility assessed subjectively by light microscopy (200 X), placing a semen droplet in a pre-warmed (37°C) slide covered by a cover slip.

For each stallion, up to two attempts were made to collect semen with an artificial vagina (Missouri or Krakow type) fitted with an in-line filter to remove the gel fraction. Each stallion was collected with a newly washed and disinfected artificial vagina. A mare in estrous was utilized as mount.

### **Semen Processing**

The collected gel-free ejaculates were diluted to a concentration of  $100 \times 10^6$  sperm cells/mL, in pre-warmed (37°C) antibiotic-free EquiPro extender (Minitub



Ibérica S.L., Tarragona, Spain), and split into two groups: standard centrifugation (C) and single layer centrifugation (SLC).

### **Control centrifugation group (C)**

Extended ejaculates were centrifuged at 900g for 10 min. After centrifugation the supernatant was removed using a sterile Pasteur pipette.

### **Single Layer Centrifugation group (SLC) centrifugation**

Fifteen mL of Androcoll-E were poured into a 45 mL sterile falcon tube and 15 mL of extended ejaculate containing  $100 \times 10^6$  spermatozoa/mL were carefully pipetted on top of the Androcoll-E layer. After centrifugation at 600g for 20 min, the supernatant (semen extender, seminal plasma and colloid) was removed using a sterile Pasteur pipette. The number of spermatozoa remaining in the pellet was obtained using a Neubauer chamber.

### **Cryopreservation**

After centrifugation, the spermatozoa pellet from both groups was cryopreserved as described by Alvarenga *et al.* (2005). Briefly, the pellet was re-suspended in an egg-yolk based freezing extender (Botucio®, Botupharma, Botucatu, Brazil) to a final concentration of  $200 \times 10^6$  sperm cells/mL, and 0.5 mL straws were filled with the extended semen. Straws were then equilibrated at 4°C for 20 min and subsequently placed in a rack located 6 cm above the liquid nitrogen surface for 25 min. Subsequently straws were plunged into liquid nitrogen and stored in a nitrogen tank. Semen manipulation and straw filling were performed in a horizontal laminar flow chamber (IDL 48.H model®, Labolan S.L., Navarra, Spain).

### **Thawing and microbial sample collections**

Straws were thawed in a water bath at 37°C for 1 min and their content transferred into a sterile eppendorf vial pre-heated at 37°C. A sample of each

straw was collected with a sterile pipette into a sterile eppendorf vial and sent refrigerated to the microbiological laboratory within six hours of collection. To this point all semen manipulation was done inside a horizontal laminar flow chamber (IDL 48.H model ®, Labolan S.L., Navarra, Spain).

### Post thawing motility evaluation

Sperm kinetics of frozen-thawed samples (C and SLC) were evaluated using a computer assisted sperm analysis system (ISAS®; Proiser, Valencia, Spain). For that, a small aliquot of each sample was collected with a sterile Pasteur pipette and gently pipetted into a chamber of ISAS-D4C20 semen slide (ISAS®; Proiser, Valencia, Spain). Five fields per sample were analysed for percentage of total motility (TM), average path velocity (VAP), curvilinear velocity (VSL), straightness index (STR) and percentage of rapid cells (RAP), using the settings described in Table 1.

**Table 1.** Settings utilized for computer-assisted semen analysis (ISAS ®).

Characteristic	Units
Number of frames	25/s
Maximum cell size	75 µm
Minimum cell size	4 µm
Velocity of rapid cells	>90 µm/s
Straightness	30%
Temperature	37°C

Loomis and Graham (2008) classified frozen-thawed semen with  $\geq 30\%$  progressive motility as “suitable” for use in commercial programs while samples with less than 30% motility rate were considered “unsuitable”. Accordingly, we also analysed the total microbial load (TML) in the SLC and C groups subdivided in “suitable” ( $\geq 30\%$  TM) and “unsuitable” ( $< 30\%$  TM) frozen-thawed samples.

## Microbial and fungal isolations and quantification

A total of forty samples that included semen from one ejaculate of each horse, splitted in two (C and SLC) were analysed. All samples were cultured for bacterial identification and quantification. A volume of 0.4 mL of each sample was diluted 1/10 in phosphate-buffered saline (PBS) solution and a standardized inoculum of 0.1 mL was plated, by spread-plate onto Columbia agar supplemented with 5% sheep blood (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), MacConkey agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and Sabouraud glucose agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and incubated under aerobic conditions at 37°C for up to 72 hours. The identification of the microbes isolated in all samples was achieved by morphologic and biochemical analysis, using the catalase, urease, coagulase, triple sugar iron, nitrate reduction, esculin tests, among others, as previously described (Cappuccino and Sherman, 1992) and by the API identification system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) according to the manufacturer's instructions. Colony forming units (CFU/mL) were calculated for each type of microbe (ML) and total microbial load (TML) of every sample was calculated.

Number of isolations was determined accordingly to the formula ( $n^{\circ}$  isolations/total  $n^{\circ}$  of samples).

Frequencies of isolations on each group were calculated using the following equation [ $(n^{\circ}$  isolations/total  $n^{\circ}$  of samples) x 100].

The difference of mean TML between groups (C and SLC) was assessed using the following formula (mean C TML – mean SLC TML).

## Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the software Prism 5 (Graph Pad S, GraphPad Prism, version 5.00 edition, San Diego, 2007).

A parametric *t* test was used to determine differences between the C and SLC group, regarding *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp., *Staph.* coagulase negative, yeasts, total microbial load (TML) and seminal kinetic parameters. Spearman correlation coefficients were used to determine the association between

TML and seminal kinetic parameters. A Mann-Whitney test was used to determine differences in TML between C and SLC groups of “suitable” and “unsuitable” frozen-thawed semen. Differences were considered significant for  $p < 0.05$ . The data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (mean $\pm$ SEM).

## Results

Number of isolations, frequency of isolations and mean microorganism load (ML), expressed in CFU/mL, per microorganism species isolated in the frozen-thawed semen are presented in Table 2.

**Table 2.** Frequency of isolation (%), number of isolations (isolated/total sampled) and mean ( $\pm$  SEM) microorganism load (ML) in colony forming units/mL (CFU/mL) of different species isolated in frozen-thawed semen subjected (SLC) or not (C) to a single layer centrifugation prior to freezing.

Isolated Species	C Frequency of isolation (Number of Isolations)	SLC Frequency of isolation (Number of Isolations)	C ML (CFU/mL) $\times 10^2$	SLC ML (CFU/mL) $\times 10^2$
<i>Enterococcus</i> spp.	100 (20/20)	95 (19/20)	14.75 $\pm$ 3.39 <sup>a</sup>	7.40 $\pm$ 0.92 <sup>b</sup>
<i>Staph. coag. negative</i>	70 (14/20)	65 (13/20)	5.43 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>	6.00 $\pm$ 1.11 <sup>a</sup>
Yeasts	65 (13/20)	65 (13/20)	150.20 $\pm$ 116.10 <sup>a</sup>	74.86 $\pm$ 68.95 <sup>a</sup>
<i>Bacillus</i> spp.	60 (12/20)	65 (13/20)	2.87 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>	1.80 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>
<i>Corynebacterium</i> spp.	50 (10/20)	45 (9/20)	53.70 $\pm$ 19.96 <sup>a</sup>	37.70 $\pm$ 24.43 <sup>a</sup>
<i>Aspergillus</i> spp.	20 (4/20)	15 (3/20)	0.80 $\pm$ 0.20	0.60 $\pm$ 0.24
<i>Streptococcus</i> spp.	5 (1/20)	0 (0/20)	1.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
<i>Aerococcus</i> spp.	5 (1/20)	5 (1/20)	3.00 $\pm$ 0.00	5.00 $\pm$ 0.00
<i>Propionibacterium</i> spp.	5 (1/20)	5 (1/20)	5.00 $\pm$ 0.00	2.00 $\pm$ 0.00
<i>Micrococcus</i> spp.	5 (1/20)	5 (1/20)	8.00 $\pm$ 0.00	4.00 $\pm$ 0.00
<i>Bacteroides</i> spp.	5 (1/20)	0 (0/20)	4.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
<i>Rhodococcus</i> spp.	5 (1/20)	5 (1/20)	1.50 $\pm$ 1.50	2.50 $\pm$ 2.50
<i>Dermobacter</i> spp.	5 (1/20)	5 (1/20)	15.00 $\pm$ 0.00	7.00 $\pm$ 0.00
<i>Actynomices</i> spp.	5 (1/20)	5 (1/20)	2.00 $\pm$ 0.00	5.00 $\pm$ 0.00
<i>Microbacterium</i> spp.	5 (1/20)	5 (1/20)	2.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00

Means in the same row with different superscripts differ ( $p < 0.05$ ).

Each sample collected resulted in the growth of a mixed microorganism population of two to seven different genera. In total, fifteen different genera were isolated, and no potentially pathogenic bacteria (*E. coli*, *Pseudomonas*

*aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus* subsp. *equi zooepidemicus*, *Staphylococcus aureus*) were isolated.

*Enterococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase negative, *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp. and yeasts, were isolated in both C and SLC groups in more than 45% of the samples and only those were subjected to statistical analysis (*t* test). Microbial load of *Enterococcus* spp. and *Bacillus* spp. was significantly higher ( $p<0.05$ ) in the C group (Table 2).

Numerically, higher mean ML was seen for all microbial species in C group but *Aerococcus* spp., *Staph.* coagulase negative, *Rhodococcus* spp. and *Actinomices* spp. (Table 2). In the ejaculates of five stallions there was growth of one microorganism species in the SLC group that was not isolated in the C group (*Aspergillus* spp. was isolated in one stallion, *Bacillus* spp. in two stallions, *Rhodococcus* spp. in one stallion and yeasts in one stallion).

The TML in the C group varied between  $17 \times 10^2$  CFU/mL and  $1703 \times 10^2$  CFU/mL, and the TML of SLC group, ranged between  $11 \times 10^2$  CFU/mL and  $987 \times 10^2$  CFU/mL.

Mean total microbial load (TML) expressed in CFU/mL, and kinetic parameters of thawed sperm (C and SLC groups) are presented in Table 3. Differences ( $p<0.05$ ) between both experimental groups were found only for TML and STR (Table 3).

**Table 3.** Mean $\pm$ SEM total microbial load (TML) expressed in colony forming units (CFU/mL), percentage of total motility (TM), average path velocity (VAP), curvilinear velocity (VSL), straightness index (STR) and percentage of rapid sperm cells (RAP) in frozen-thawed semen subjected (SLC) or not (C) to a single layer centrifugation prior to freezing.

	TML (CFU/mL) $\times 10^2$	TM (%)	VAP $\mu\text{m}/\text{seg}$	VSL $\mu\text{m}/\text{seg}$	STR (%)	RAP (%)
C	155.60 $\pm$ 83.81 <sup>a</sup>	38.29 $\pm$ 5.02	28.34 $\pm$ 1.50	18.75 $\pm$ 1.26	65.52 $\pm$ 1.19 <sup>a</sup>	2.84 $\pm$ 0.19
SLC	88.65 $\pm$ 48.85 <sup>b</sup>	32.54 $\pm$ 4.08	27.63 $\pm$ 1.69	19.83 $\pm$ 1.64	70.38 $\pm$ 1.83 <sup>b</sup>	2.61 $\pm$ 0.18

Means in the same column with different superscripts differ ( $p<0.05$ ).

Post-thawed semen in the SLC group had less  $66.95 \times 10^2$  CFU/mL than thawed semen of the C group (mean C TML – mean SLC TML), which represents around 43% of the C group mean TML.

No correlation was found ( $p > 0.05$ ) between TML and seminal kinetic parameters, in both C and SLC groups.

Total microbial load “suitable” frozen-thawed semen was significantly lower for the SLC samples ( $p < 0.05$ ; Table 4) but did not differ between C and SLC groups for “unsuitable” frozen-thawed semen ( $p > 0.05$ ).

**Table 4.** Mean $\pm$ SEM total microbial load (TML), measured in colony forming units (CFU)/mL of thawed semen with more (“suitable”) and less (“unsuitable”) than 30% of total motility (TM), subjected (SLC) or not (N) to a single layer centrifugation prior to freezing.

Group	TML “suitable” frozen-thawed semen (CFU/mL) $\times 10^2$	TML “unsuitable” frozen-thawed semen (CFU/mL) $\times 10^2$
C	51.33 $\pm$ 33.26 <sup>a</sup>	240.90 $\pm$ 498.20 <sup>a</sup>
SLC	26.78 $\pm$ 12.39 <sup>b</sup>	139.30 $\pm$ 290.30 <sup>a</sup>

Means in the same column with different superscripts differ ( $p < 0.05$ ).

## Discussion

The external genitalia of stallions harbour wide variety of microorganisms (Bristol, 1991; Malmgren *et al.*, 1998; Pasing *et al.*, 2013; Varner *et al.*, 1998) that are transmitted to ejaculate (Samper and Tibary, 2006; Rota *et al.*, 2011). Type, load and characteristics of frozen-thawed stallion’s semen microorganisms have not been extensively investigated (Corona and Cherchi, 2009; Najjar *et al.*, 2010, Ortega-Ferrusola *et al.*, 2008). In the present study all samples had a mixed microorganism population, which is in agreement with previous studies (Corona and Cherchi, 2009; Ortega-Ferrusola *et al.*, 2008). Similarly to Ortega-Ferrusola *et al.* (2008) we did not isolate opportunistic pathogens such as *E. coli*, *Strep. zooepidemicus*, *Ps. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and *Staph. aureus* in frozen thawed semen. However, others have isolated *Ps. aeruginosa* from stallion’s frozen-thawed semen (Corona and Cherchi, 2009; Najjar *et al.*, 2010). The difference among studies in type of species isolated from frozen-thawed semen

probably reflects dissimilar bacterial population of the stallion's external genitalia between studies.

Ranges and mean values of total microbial load in frozen-thawed semen are highly variable in the literature. Corona and Cherchi (2009) obtained a range of 0 to  $6000 \times 10^2$  CFU/mL per sample, while Najjar *et al.* (2010) registered a mean of  $320 \times 10^2$  CFU/mL. In our study, a range of  $17 \times 10^2$  CFU/mL to  $1703 \times 10^2$  CFU/mL were isolated in the control group, and a mean value of  $155.60 \times 10^2$  CFU/mL (C group). These TML values are in the lower limits described in previous studies.

The microflora of the external genitalia is dependant, among other factors, of the geographical location and environment (Madsen and Christensen, 1995; Samper and Tibary, 2006). The microorganisms with frequencies of isolation above 45% (*Enterococcus* spp., *Bacillus* spp., *Staph.* coagulase negative, *Corynebacterium* spp. and yeasts) are part of the typical microbial content of semen and external genitalia previously isolated for stabled stallions in the studied areas (Guimarães *et al.*, 2014). Differences in ML between SLC and C samples were only significant ( $p < 0.05$ ) for *Enterococcus* spp. and *Bacillus* spp., indicating that the SLC technique utilized was efficient to decrease the CFU/mL of these two species. Despite the lack of statistical significance, a global trend of less ML per microorganism in the SLC group was observed, with the exceptions of *Aerococcus* spp., *Staph.* coagulase negative, *Rhodococcus* spp. and *Actynomices* spp. (Table 2). In the frozen-thawed samples of five stallions, microorganisms that were not isolated in the C group samples were found in the SLC treated group. This may possibly be attributed to cross contamination (by the operator), despite the hygienic measures taken, which included manipulation of samples in a laminar flow chamber, and thus highlights the need for strict sanitary procedures while manipulating semen samples.

In our study the TML of the SLC group ( $88.65 \pm 48.85 \times 10^2$  CFU/mL) was lower ( $p < 0.05$ ) than that of the C group ( $155.60 \pm 83.81 \times 10^2$  CFU/mL) (Table 3). The TML difference between the two groups is approximately 43%, which is not negligible. To our best knowledge, only Morrell *et al.* (2014) tested an SLC technique as a “filter” of bacteria in fresh stallion ejaculates. These authors, also using Androcoll-E, removed 97% of *E. coli*, 93% *K. pneumoniae*, 93% *Strep. zooepidemicus* and 81% of *Taylorella equigenitalis* that were “spiked” into

ejaculates (fresh semen). However, due to large experimental design differences it's impossible to compare the results between studies.

Morrell *et al.* (2014) mentioned that there might be differences between bacteria used for “spiking” and naturally occurring microorganisms in the ejaculate, as well as the way they interact with the sperm cells. In our study, none of the species isolated were potentially pathogenic, true pathogens or supposed to have deleterious effect in stored chilled semen. Thus, further studies are warranted in order to assess the effect of SLC in naturally-occurring undesirable bacteria. Nonetheless, we observed that in the non-pathogenic naturally-occurring bacteria, the cleansing effect was species-dependent (*Enterococcus* spp. and *Bacillus* spp.).

Hoogewijs *et al.* (2011) reported an overall increase in frozen-thawed semen quality when isopycnic centrifugation with Androcoll-E was applied before cryopreservation. Contrary to their results, we did not find evidence of improved kinetics ( $p>0.05$ ) in SLC samples, as only STR had an increase. Furthermore, no correlation ( $p>0.05$ ) between TML and sperm kinetic parameters was found in both C and SLC groups. The STR difference ( $p<0.05$ ), between C and SLC groups, is difficult to explain, but the lack of correlation between STR and TML (in both groups), lead us to devaluate that difference.

In human semen, bacteria adhering to spermatozoa can impair sperm motility (El-Barawy *et al.*, 2010). Similarly, Hoogewijs *et al.* (2011) suggested that reduced bacteriological contamination might also be responsible for the increased quality of thawed semen, following SLC selection. Again, our do not support that hypothesis, since SLC treatment managed to reduce significantly ( $p<0.05$ ) TML without altering thawed seminal quality ( $p>0.05$ ) between treated and non-treated samples.

Nevertheless, TML in “unsuitable” frozen-thawed semen was not decreased by SLC treatment ( $p>0.05$ ) in opposition to what happened for the total samples, and for “suitable” frozen-thawed samples. This suggests some sort of interaction between bacterial load and capability of SLC to remove bacteria in samples with higher percentages of dead or damaged spermatozoa. It would be of interest to investigate if bacteria interact with immotile sperm cells changing the isopycnic point of the bacteria-sperm cell complex inhibiting its “filtration” by SLC.



## Conclusions

The application of the SLC technique through Androcoll-E prior to semen cryopreservation decreased total microbial load, specifically the number of *Enterococcus* spp. and *Bacillus* spp. colony forming units, in frozen-thawed sperm. However, the TML reduction was not observed in samples with less than 30% total motility after thawing. The SLC treatment of fresh semen prior to cryopreservation did not affect post-thaw seminal parameters (excluding STR).

## Acknowledgement

This work was partially financed by Project PTDC/CVT/108456/2008 (FCT) and COMPETE:FCOMP-01-0124-FEDER-009565 (FEDER).

## References

- Allen WR. 2005. The development and application of the modern reproductive technologies to horse. Breeding. *Reproduction in domestic Animals*, **40**: 310-329.
- Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL. 2005. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Animal Reproduction Science*, **89**: 105–113.
- Aurich C, Spergser J. 2007. Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. *Theriogenology*, **67**: 912-918.
- Bristol F. 1991. Bacterial flora of the reproductive tract in stallions. *Society Theriogenology Annual Meeting*, San Diego, pp: 171–173
- Cappuccino JG, Sherman N, 1992: Biochemical activities. In: Cappuccino JG, Sherman N (ed.), *Microbiology; A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> edition. Rockland Community College, Suffern, NY, USA, pp: 127-178.
- Corona A, Cherchi R. 2009. Microbial quality of equine frozen semen. *Animal Reproduction Science*, **115**: 103–109.
- Costa AL, Martins-Bessa A, Rebello de Andrade A, Guimarães T, Rebordão MR, Gambôa S, Pinto Bravo P, Correia MJ, Colaço J, Gaivão I, Rocha A. 2012. Single Layer Centrifugation with Androcoll-E™ improved progressive

- motility and percentage of live spermatozoa with intact acrosome of chilled stallion semen but did not have an effect on DNA integrity. *Open Journal of Animal Sciences*, **2** (3):159-165.
- El-Bahrawy KA, El Sayed E, El-Hassanein, Kamel YA. 2010. Comparison of gentamicin and ciprofloxacin in dromedary camels semen extender. *World Journal of Agricultural Sciences*, **6** (4): 419-424.
- Fourie J, Loskutoff N, Huyser C. 2011. Elimination of bacteria from human semen during sperm preparation using density gradient centrifugation with a novel tube insert. *Andrologia*, **44**: 513–517
- Guimarães T, Carnevalheira C, Rocha A. 2011. Conception rate, uterine infection and embryo quality after artificial insemination and natural breeding with a stallion carrier of *Pseudomonas aeruginosa*: a case report. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **54**: 20-25.
- Guimarães T, Miranda C, Pinto M, Silva E, Damásio L, Costa AL, Correia MJ, Duarte JC, Lopes G, Thompson G, Rocha A. 2014. Effect of the breeding activities in the microflora of the stallion external genitalia. *Accepted for oral presentation at VI Congress of Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias*.
- Hoogewijs M, Morrell J, Van Soom A, Govaere J, Johannisson A, Piepers S, De Schauwer C, De Kruif A, De Vliegher S. 2011. Sperm selection using single layer centrifugation prior to cryopreservation can increase thawed sperm quality in stallions. *Equine Veterinary Journal*, **43**: 35-41.
- Johannisson A, Morrell JM, Thorén J, Jönsson M, Dalin A-M, Rodriguez-Martinez H. 2009. Colloidal centrifugation with Androcoll-E™ prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Animal Reproduction Science*, **116**: 119-128.
- Johansson A, Greko C, Engström BE, Karlsson M. 2004. Antimicrobial susceptibility of 364 Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry, and 365 distribution of tetracycline resistance genes. *Veterinary Microbiology*, **99**: 251-257.
- Kuisma P, Andersson M, Koskinen E, Katila T. 2006. Fertility of frozen thawed stallion semen cannot be predicted by the current used laboratory methods. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **48**: 14-21.

- Loomis PR, Graham JK. 2008. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*, **105**: 119-128.
- Macías García B, Morrell JM, Ortega-Ferrusola C, González-Fernández L, Tapia JA, Rodríguez-Martínez H, Peña FJ. 2009. Centrifugation on a single layer of colloid selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed stallion semen. *Animal Reproduction Science*, **114**: 193–202.
- Madsen M and Christensen P. 1995. Bacterial flora of semen collected from Danish Warmblood stallions by artificial vagina. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **36**: 1-7.
- Malmgren L, Engvall EO, Engvall A, Albiñ A. 1998. Aerobic bacterial flora of semen and stallion reproductive tract and its relation to fertility under field conditions. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **39**: 173-182.
- Morrell M, Klein C, Lundeheim N, Erol E, Troedsson MHT. 2014. Removal of bacteria from stallion semen by colloid centrifugation. *Animal Reproduction Science*, (In Press).
- Morrell JM, Wallgren M. 2011. Removal of bacteria from boar ejaculates by Single Layer Centrifugation can reduce the use of antibiotics in semen extenders. *Animal Reproduction Science*, **123**: 64–69.
- Najjar A, Ben Said S, Benaoun B, Ezzaouia M, Sattouri J, Ben Mrad M, Messadi L. 2010. *Journal of Reproduction and Infertility*, **1** (suppl 3): 62-65
- Nicholson CM, Abramsson L, Holm SE, Bjurulf E. 2000. Bacterial contamination and sperm recovery after semen preparation by density gradient centrifugation using silane-coated 390 silica particles at different g forces. *Human Reproduction*, **15**: 662-666.
- Ortega-Ferrusola C, González-Fernández L, Muriel A, Macías-García B, Rodríguez-Martínez H, Tapia JA, Alonso JM, Peña FJ. 2009. Does the Microbial Flora in the Ejaculate Affect the Freezeability of Stallion Sperm?. *Reproduction in Domestic Animals*, **44**: 518–522.
- Pasing S, Aurich C, Von Lewinski M, Wulf M, Krüger M, Aurich JE. 2013. Development of the genital microflora in stallions used for artificial insemination throughout the breeding season. *Animal Reproduction Science*, **139**: 53– 61

- Rota A, Calicchio E, Nardoni S, Fratini F, Ebani VV, Sgorbini M, Panzani D, Camillo F, Mancianti F. 2011. Presence and distribution of fungi and bacteria in the reproductive tract of healthy stallions. *Theriogenology*, **76**: 464–470.
- Samper J, Tibary A, 2006: Disease transmission in horses. *Theriogenology*, **66**: 551-559.
- Sieme H, Harrison RAP, Petrunkina AM. 2008. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Animal Reproduction Science*, **107**: 276–292.
- Stoll A, Love CC, Ball BA. 2013. Use of a single-layer density centrifugation method enhances sperm quality in cryopreserved-thawed equine spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, **33**: 547-551.
- Varner DD, Scanlan CM, Thompson JA, Brumbaugh GW, Blanchard TL, Carlton CM, Johnson L. 1998. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. *Theriogenology*, **50**: 559-573.

## **Capítulo 3: Conception rate, uterine infection and embryo quality after artificial insemination and natural breeding with a stallion carrier of *Pseudomonas aeruginosa*: a case report.**

(Adaptado de: Guimarães T, Carvalheira C, Rocha A. 2011. Conception rate, uterine infection and embryo quality after artificial insemination and natural breeding with a stallion carrier of *Pseudomonas aeruginosa*: a case report. *Acta Veterinaria Scandinavica* 54: 20-25.

## Summary

Semen from a Holstein stallion with *Pseudomonas aeruginosa* infection was used to perform inseminations with fresh extended and frozen/thawed semen, to both obtain pregnancies and to collect embryos. The stallion was also used for natural service for the same purposes. Pregnancy rates as well as embryo recovery rates obtained after natural service with the infected stallion seemed to reach acceptable levels. However, more than half of the natural services resulted in uterine disease, while delayed uterine clearance or metrites were seen only in 22% of the times following insemination. Two out of the 4 mares bred by natural service got positive to *P. aeruginosa*. Percentage of embryo recovery rates was identical after IA or natural service (66.7%). The 4 embryos recovered after AI, were classified as Grade 1, while only 2 Grade 1 embryos were obtained after natural service. It was concluded that: a) there was no evidence of reduced fertilization after AI or natural service using this *P. aeruginosa* carrier stallion, b) a higher incidence of uterine disease was noticed after natural service than after IA, d) venereal transmission of *P. aeruginosa* after natural service was confirmed, d) a lower embryo quality may be obtained after natural service as compared to IA. Overall, the data supports the indication for *P. aeruginosa* - carrier stallions to be bred by IA rather than by natural service.

**Keywords:** Stallion, *Pseudomonas aeruginosa*, Venereal diseases, Artificial insemination, Embryo quality

## Introduction

Horses may harbor *Pseudomonas aeruginosa* in the genitalia in percentages that ranged from 4% (Frontoso *et al.*, 2008) to 10% (Hughes and Loy, 1974) in mares and as high as 36% in stallions (Hughes and Loy, 1974). *P. aeruginosa* can cause venereal disease and infertility in the equine (Blanchard *et al.*, 1987; Hughes *et al.*, 1966) and it is generally accepted that stallions contaminated with this bacteria need to be considered potential carriers of a venereal-transmitted disease (Crabtree, 2010), in particular when used to breed older mares (Hugues and Loy, 1974).

*P. aeruginosa* is frequently multi-resistant to antibiotics and is the most potent biofilm pathogen of the equine reproductive tract (LeBlanc and Causey, 2009). Washing of the stallion penis with disinfectants may lead to unwanted colonization by yeasts and pathogenic bacteria. Therefore, artificial insemination associated with minimum contamination techniques is considered to have a distinct advantage over natural service to control the transmission of these bacteria (Blanchard *et al.*, 1987). However, the effect of those techniques on the control of the disease and even the rate of transmission by infected stallions after natural service is poorly documented and the effect of natural service by *P. aeruginosa*-carrier stallions in embryo quality have not been reported. In the present work we describe the conception rates obtained after natural service with a stallion carrier of *P. aeruginosa*, the conception rates after artificial insemination (AI) with fresh extended and frozen/thawed semen of the same stallion, the incidence of uterine disease with either method of breeding, as well as embryo recovery rates and embryo quality after IA and natural mating.

## Material and Methods

A Holstein stallion brought to the Centre of Animal Reproduction of ICBAS, University of Porto was subjected to swabbing of the penis, prepuce and distal urethra for isolation of *Taylorella equigenitalis*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomona aeruginosa*, with the latter being isolated in the first sampling and in four additional samplings.

The stallion had been used for natural breeding, produced progeny, but no accurate data on his fertility could be obtained. No inflammatory cells were detected in the ejaculates and ultrasound examination (Aloka Prosound 2 with 5 and 7.5-10 MHz probes) of the bulbourethral glands, prostate, seminal vesicles and ampullae did not evidence any sign of pathology. Samples from eight different ejaculates collected with artificial vagina (Missouri model) after careful cleaning of the stallion's penis with warm water were negative for *P. aeruginosa*. After that, no further attempts to isolated bacteria from the semen or genitalia were performed before semen collection or natural breeding. Nevertheless, at the end of the breeding season one more sample was collected from semen and genitalia and both tested positive to *P. aeruginosa*.

None of the uterine and clitoral samples collected from all the mares at the time of admission in the center resulted in the isolation of *T. equigenitalis*, *K. pneumoniae* or *P. aeruginosa*. All mares subjected to natural mating were re-evaluated for *Pseudomonas aeruginosa* by culture of clitoral and endometrial swabs. Endometrial biopsies were performed in two 18 yr old mares that displayed uterine infection and failed to get pregnant.

Mares were teased every other day using a stallion. After evidence of estrus behavior, the mare uterus and ovaries where examined daily by ultrasound scanning (Aloka Prosound 2 with 5 and 7.5-10 MHz probes) and 1500 UI of hCG (Chorulon®, Intervet) was administered (iv) after detection of a follicle with a diameter  $\geq 35$  mm. Twenty four hours later semen was collected after careful cleaning of the penis with warm water and diluted at a concentration of  $50 \times 10^6$  sperm cells/mL in an antibiotic-free extender (E-Z Mixin, Animal Reproduction Systems, Chino, CA, USA) for AI with fresh semen, and the mares were inseminated with approximately  $450$  to  $600 \times 10^6$  sperm cells with progressive motility. Artificial insemination with frozen semen was performed  $\leq 6$  hours post ovulation with approximately  $300 \times 10^6$  sperm cells with progressive motility. The stallion was also used to breed 4 mares by natural service. For that, the same management used for AI including the cleaning of the stallion's penis was used, with the AI replaced by natural service.

No filling of the uterus with extender immediately prior to natural service as described originally for the minimum contamination technique (Kenney *et al.*, 1975) was done, to facilitate the confirmation of ejaculated semen in the uterus by



ultrasound scanning. Ultrasound examinations were repeated daily after IA or natural service to confirm ovulation and to assess uterine clearance until day 4 post-ovulation

When uterine fluid was present 24 h post IA (delayed uterine clearance/metritis) mares were treated with 3 IU of ocitocine i.v. (Placentol, Syva S.A.) 2 to 3 times daily and the uterus was flushed with saline. One mg/day of Cetiofur (Excenel®, Pfizer) was infused in the uterus up till day 4 post ovulation when purulent uterine exudates were recovered, when a neutrophile-positive uterine swabbing was detected, and in all mares after natural service.

Eleven inseminations were performed with fresh-extended semen in 7 mares. Additionally, 2 mares were inseminated with fresh-extended semen (1 AI/mare) for embryo collection.

Ten inseminations were performed with frozen semen in 7 mares. Uterine biopsies were collected from 2 of these mares that were 18- years old and did not get pregnant. In addition, 4 inseminations with frozen semen were performed in two mares, during two consecutive cycles, for embryo collection.

Two mares were mated by natural service in a single estrous cycle/mare. A 3rd mare, that had turned positive to *P. aeruginosa* after previously being bred by natural service for embryo collection, was bred by natural service to get impregnated, in two consecutive estrus cycles. Two mares were allocated to be bred by natural service for embryo collection. A total of 9 natural services were performed in these 2 mares.

Pregnancy checks were done by ultrasound examination between days 12 to 16 post ovulation.

Embryo recoveries were attempted passing a catheter with inflatable cuff connected to a sterile flexible 2-way flushing catheter through the cervix of the donor mares, after careful washing of the vulva. Once in the body of the uterus, the cuff was inflated with 50 to 70 mL of air and the catheter pulled backwards onto the internal os of the cervix to seal off the uterus. Between 2 to 3 Lts of either warmed Ringer lactate (Laboratorio sorologico, Amadora, Portugal) for embryo collections from days 7 to 10 post-ovulation were infused into the uterus. Phosphate buffered saline (Gibco®, Paisley, UK) containing 0.5% heat inactivated fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) was used for collections at day 6 post ovulation. The media was recovered by gravity flow into

an Em-Con filter, after which the cuff was deflated to allow the withdrawal of the flushing catheter. The medium in the filter was then transferred to a Petri dish and embryos searched using a stereoscope. The embryos were graded from 1 (excellent) to 4 (degenerated/dead) as recently reviewed by McCue *et al.* (2009).

All mares had an intensive sports background, were 12 to 18 years old and had been barren for at least several years.

## **Results**

### **Pregnancy rates, metritis/delayed uterine clearance**

All of the 7 mares inseminated with fresh-extended semen got pregnant. Only one of these mares required post-IA treatment for delayed uterine clearance. No delayed uterine clearance was detected in the 2 mares inseminated with fresh-extended semen for embryo collection and one embryo was collected.

Four of the 7 mares inseminated with frozen semen got pregnant, resulting in a pregnancy rate per cycle of 40%, and a total pregnancy rate of 57%. A grade III Kenny's histological classification was attributed to the endometrium of the two 18 years-old mares that failed to get pregnant. Embryos were recovered in 3 out of 4 flushings (75% recovery rate).

Two of the 3 mares bred by natural service got pregnant. *P. aeruginosa* was isolated from one of the pregnant mares (clitoral swab) and from one of the mares that did not get pregnant (clitoral/uterine swab). Embryos were collected in 6 out of 9 flushings (66% recovery rate).

Data on pregnancy rates obtained after IA and natural services are detailed in Table 1.

**Table 1.** Pregnancy rates after AI with fresh extended and frozen thawed semen, and after natural service.

	Nº of Mares	Nº of Services	Pregnant mares/cycle (%)	Total pregnant mares (%)	IA/Pregnancy*
AI fresh extended	7	11	7/11 (64)	7 (100)	1.57
AI frozen/thawed	7	10	4/10 (40)	4 (57)	2.5
Natural Service	3	4	2/4 (50)	2 (67)	2.0

\* Includes mares that did not get pregnant.

In total, 6 cases (22%) of delayed uterine clearance/metritis were noted after the 27 IAs performed with fresh or frozen/thawed semen, either for pregnancy or for embryo collection, while 7 cases (54%) of metritis were diagnosed after the 13 natural services performed by the stallion for the establishment of pregnancies or for embryo collection.

### Embryo quality

The embryo recovered after AI with fresh semen was classified as a day 8, grade I blastocyst. Two day 8, grade 1 blastocysts and a day 10, grade 1 expanded blastocysts were obtained after insemination with frozen semen. In relation to embryo quality after natural breeding, the results were as follow: one grade 4 morula after a day 8 flushing, a grade 2 morula and a grade 1 blastocyst after a day 8 flushing of a mare with two ovulations within a 3 day interval, a grade 2 and a grade 4 blastocysts in two nine-day flushings, respectively and a grade 1 expanded blastocyst after a day 10 flushing.

**Table 2.** Results obtained in relation to embryo recovery rates and embryo quality after natural service or AI.

	Nº of Mares	Nº of Services	Embryos/Flushing (%)	Grade 1 Embryos/ Total Embryos (%)	Grade 2 Embryos/ Total Embryos (%)	Grade 3-4 Embryos/ Total Embryos (%)
AI	4	6	4/6 (66.7)	4/4 (100)	---	---
Natural Service	2	9	6/9 (66.7)	2/6 (33.3)	2/6 (33.3)	2/6 (33.3)

## Discussion

The results of this study were based on a limited number of observations and thus no solid inferences can be made about the fertilizing ability of inseminated semen vs natural service for this stallion. Notwithstanding that, conception rates and embryo recovery rates after AI with fresh and frozen semen can be considered acceptable. A somewhat lower conception rate with frozen semen may certainly be attributed to degenerative conditions of the endometrium of two older mares that failed to get pregnant. Pregnancy rates as well as embryo recovery rates obtained after natural service with the infected stallion seemed to reach acceptable levels. These positive results may have been due, at least in part, to the intensive uterine treatments performed right after every natural service, up till day 4 post ovulation. On the other hand, more than half of the natural services resulted in uterine disease, while delayed uterine clearance or metritis were seen only in 22% of the times following insemination. Furthermore, two out of the 4 mares bred by natural service got positive to *P. aeruginosa* and thus may have acquired the potential to transmit the bacteria if bred by natural service.

The vast majority of recovered equine embryos tend to be of good to excellent quality McCue *et al.* (2009). In the present case all embryos collected after AI were of excellent quality. However, and despite identical embryo recovery rates after AI or natural service, embryo quality was decreased after the latter, compared to AI. In cattle, the use of *P. aeruginosa* – contaminated semen did not result in decreased embryo quality (Eaglesome *et al.*, 1995). However, in the bovine and contrary to what happens in the equine species, *P. aeruginosa* it is not considered to be a potentially venereal transmitted disease. The data suggest that natural service with a *P. aeruginosa*-carrier stallion resulted in acceptable

fertilization rates, but despite aggressive post-insemination treatments originated a higher percentage of lower quality embryos.

It can be concluded that: a) there was no evidence of reduced fertilization after IA or natural service using this *P. aeruginosa* carrier stallion, b) a higher incidence of uterine disease was noticed after natural service than after IA, d) venereal transmission of *P. aeruginosa* after natural service was confirmed, d) a lower embryo quality was obtained after natural service compared to IA. Overall, the data supports the indication for *P. aeruginosa* - carrier stallions to be bred by AI rather than by natural service.

### **Acknowledgements**

This work was partially financed by Projects PTDC/CVT/108456/2008 (FCT) and COMPETE:FCOMP-01-0124-FEDER-009565 (FEDER). The authors appreciatively acknowledge the revision of the final manuscript by Dr. John Edwards, College of Veterinary Medicine, Texas A&M University.

### **References**

- Blanchard TL, Varner DD, Love CC, Hurtgen JP, Cummings MR, Kennedy RM. 1987. Use of a semen extender containing antibiotic to improve the fertility of a stallion with seminal vesiculitis due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Theriogenology*, **28**: 541-546.
- Crabtree J. 2010. Prebreeding examination of the stallion 1. Physical examination. *In Practice*, **32**: 22-28.
- Eaglesome MD, Garcia MM, Bielanski AB. 1995. A study on the effect of *Pseudomonas aeruginosa* in semen on bovine fertility. *Canadian Journal Of Veterinary Research*, **59**: 76-78.
- Frontoso R, De Carlo E, Pasolini MP, van der Meulen K, Pagnini U, Iovane G, De Martino L. 2008. Retrospective study of bacterial isolates and their antimicrobial susceptibilities in equine uteri during fertility problems. *Research in Veterinary Science*, **84**: 1-6.

- Hughes JP, Loy RG, Asbury AC, Burd HE. 1966. The occurrence of *Pseudomonas* in the reproductive tract of mares and its effect on fertility. *Cornell Veterinary*, **56**: 595-610.
- Hughes JP, Loy RG. 1974. The relation of infection to infertility in the mare and stallion. *Equine Veterinary Journal*, **7**: 155-159.
- Kenney RM, Bergman RV, Cooper WL, Morse GW. 1975. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners*, pp: 327-336.
- LeBlanc MM, Causey RC. 2009. Clinical and subclinical endometritis in the mare: Both threats to fertility. *Reproduction of Domestic Animals*, **44** (Suppl. 3): 10-22.
- McCue PM, DeLuca CA, Ferris RA, Wall JJ. 2009. How to evaluate equine embryos. *Proceedings of the 55<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, pp: 252-256.

## **Capítulo 4:** Characteristics of stallion epididymal spermatozoa at collection and effect of two refrigeration protocols on the quality of the frozen-thawed sperm cells

(Adaptado de: Guimarães T, Lopes G , Ferreira P, Leal I, Rocha A. 2012. Characteristics of stallion epididymal spermatozoa at collection and effect of two refrigeration protocols on the quality of the frozen/thawed sperm cells. *Animal Reproduction Science*, **136**: 85-89)

## Summary

Cryopreservation of epididymal spermatozoa is a useful tool to preserve genetic material of valuable stallions after emergency castration or unexpected death. For that, testicles and epididymides are generally sent refrigerated to the laboratory. Collection of epididymal spermatozoa is a simple procedure that reduces the volume of the material to be shipped, and may improve the quality of the chilled epididymal sperm cells. In the present study we compared the characteristics of frozen/thawed epididymal spermatozoa after refrigeration of the epididymis or after direct refrigeration of the extended epididymal sperm cells. Ejaculated sperm samples were obtained from 10 healthy stallions with at least 15 days of sexual rest, before routine orchiectomies. Spermatozoa were recovered from the epididymal tail immediately after castration (EPI), after refrigeration of the epididymis for 24 h at 4°C (EPI R) and recovered from epididymal tail immediately after castration and stored for 24 h at 4°C (EPI RR). Total motility, straight line velocity, percentage of rapid cells, viability and morphological defects were similar ( $p>0.05$ ) among different treatments, and post-thaw viability was higher ( $p<0.05$ ) in EPI than in the ejaculated sperm. The similarity of post-thaw parameters lead us to conclude that immediate collection and refrigeration of the epididymal sperm cells or refrigeration of the whole epididymis are equally efficient as a means of transporting material for 24 h before cryopreservation of epididymal spermatozoa.

**Keywords:** stallion, epididymal sperm cells, cryopreservation



## Introduction

In cases of unexpected death or emergency castration of valuable stallions, their genetic material can be kept for future use by the recovery and cryopreservation of extra gonadal sperm reserves. The tail of the epididymis is a reservoir of mature spermatozoa, where they are kept in a metabolic quiescent state to prevent premature activation, and in the stallion it has an estimate capacity to store enough sperm cells for 10 ejaculates (Caballero *et al.*, 2011; Sostaric *et al.*, 2008). The most efficient technique for collection of equine epididymal spermatozoa is the retrograde flushing of the epididymal tail (Tiplady *et al.*, 2001), which allows the recovery of up to 15 to 20 billion sperm cells (Bruemmer, 2006).

The viability of spermatozoa in the epididymal tail decreases abruptly after 24 h at 22°C (Murádas *et al.*, 2006), but good viability results have been reported for stallion epididymal sperm for up to 96 h if the testes/epididymides are maintained at 4°C (James *et al.*, 2002). As the majority of deaths and emergency castrations occur in places geographically distant from a cryopreservation laboratory, storing and transportation of the gonads for up to 24 h is frequently needed before spermatozoa cryopreservation can be performed. Investigations comparing immediate collection versus cold storage procedures of the testes/epididymis after orchiectomy or post-mortem (Bruemmer *et al.*, 2002; Monteiro *et al.*, 2011b) showed that the refrigeration of testes/epididymes for 24 h before recovery and cryopreservation of sperm cells was efficient in preserving sperm viability both pre-freezing and post-thawing (Bruemmer *et al.*, 2002; Monteiro *et al.*, 2011b). Furthermore, a recent study showed that frozen-thawed spermatozoa recovered from the epididymal tail either immediately after castration or after 24 h of refrigeration of the epididymis have the same fertility as ejaculated sperm (Monteiro *et al.* 2011b).

It remains to be tested if 24 h refrigeration of the extended equine epididymal tail spermatozoa has any influence on the quality of frozen-thawed epididymal spermatozoa. The advantages of shipping diluted epididymal sperm cells instead of the gonads with the epididymis would be the reduction of the volume and weight of the shipped material, ultimately decreasing shipping costs. Also, refrigeration of the sperm cells instead the whole gonad containing them,

may improve freezability of the sperm cells. Thus, the objective of the present study was to compare the characteristics and quality of frozen/thawed epididymal spermatozoa obtained: a) immediately after orchiectomy; b) after 24 h of refrigeration in an extender; c) after collection from testicle/epididymis refrigerated for 24 h. The quality of frozen/thawed epididymal spermatozoa was also compared with frozen/thawed ejaculates of the same stallions, collected by artificial vagina.

## **Material and methods**

### **Animals and Experimental Design**

Ten healthy stallions of different breeds (1 Peruvian Paso Fino, 8 Lusitano Cross-Breds and 1 Lusitano Stallion) with ages ranging from 3 to 10 years that were admitted for routine orchiectomies were utilized. All animals in this study had at least 15 days of sexual rest before entering this experiment.

Semen was collected by artificial vagina, using a mare in heat as a mount. Ejaculated semen (AV group) was immediately processed, evaluated and cryopreserved. Fifteen days after semen collection, stallions were submitted to bilateral orchiectomy, and one testicle and corresponding epididymis was stored at 4°C for 24 hours (EPI R group) before processing, while the epididymal tail of the contralateral testicle was immediately flushed for spermatozoa recovery. The recovered spermatozoa suspension was divided in two samples with equal volumes; one sample was immediately evaluated and processed for cryopreservation (EPI group), while the other was stored at 4°C for 24 h at the obtained concentration, before freezing (EPI RR group). After 24 hours chilling of the contralateral testicle/epididymis (EPI R), the epididymal tail was flushed for spermatozoa recovery, and the recovered spermatozoa were cryopreserved (EPI R group). The left and right epididymides were equally distributed between the ones immediately processed (EPI and EPI RR) and the ones refrigerated for 24 h before sperm cells recovery and freezing (EPI R). The observations of epididymal tail weight and total number of sperm cells harvested were also registered in left and right epididymis.

### **Collection of ejaculated spermatozoa**

For each stallion, up to two attempts were made to collect semen with an artificial vagina (Missouri type) lubricated with non-spermicidal gel and filled with warm water to obtain an inner temperature of 45-50°C. A mare in estrous was utilized as mount. Ejaculated semen was immediately evaluated for volume, concentration, progressive motility (PMO), percentage of live sperm cells (Viability) and percentage of morphological defects (DEF). Semen was then diluted (1:1, v:v), in a pre-warmed (37°C) Kenney's medium and subsequently processed for cryopreservation.

### **Harvesting of epididymal tail spermatozoa**

Bilateral orchiectomy was carried out in a standing position, under deep sedation (20-40 µg/kg of detomidine hydrochloride depending upon the stallion reaction, Domosedan®, Laboratórios Pfizer, Portugal) and local anaesthesia, (600 mg of lidocaine hydrochloride, Anestesisin®, Laboratório Sorológico, Portugal). After castration, testis and the corresponding epididymis were immediately taken to an adjacent laboratory and testis and epididymal tail weights were registered. Epididymectomy and flushing of the epididymal tail were performed immediately after castration (EPI and EPI RR groups) or 24 h later (EPI R group). For this procedure, the epididymal tail and vas deferens were isolated from the testis and carefully dissected removing all connective tissue and fascias. The epididymal tail duct was then cut when its diameter was less than 1mm. A 21 ga needle was inserted into the open end of vas deferens 1 cm above the epididymal tail and a flushing with 50 mL of Kenney's medium pre-warmed (37°C) was performed into a 50 mL Falcon tube.

Spermatozoa suspensions were evaluated for concentration, progressive motility (PMO), percentage of live sperm cells (Viability) and percentage of morphological defects (DEF) after flushing fresh (EPI) and refrigerated (EPI R) epididymis, as well as after flushing spermatozoa in epididymis refrigerated for 24 h (EPI RR). Samples of all experimental groups were cryopreserved.

## Cryopreservation and thawing

The ejaculates (AV) and all epididymal spermatozoa suspensions obtained (EPI, EPI R and EPI RR) were centrifuged 10 min at 900 x g and the supernatant was discarded. Cryopreservation of sperm cells was then performed as described by Monteiro *et al.* (2011b). Briefly, the pellet was re-suspended in an egg-yolk based freezing extender (Botucio®, Botupharma, Botucatu, Brazil) to a final concentration of 200 million sperm cells per mL. Five straws (0.5 mL) were filled for each experimental group and maintained at 4°C for 20 min. Subsequently, straws were placed 6 cm above the liquid nitrogen surface and kept in nitrogen vapours for 25 min. After this period straws were immersed in liquid nitrogen and stored. Straws were thawed in a water bath, at 37°C for 1 min, and its content transferred into an eppendorf tube pre-heated at 37°C.

## The evaluation of ejaculated and epididymal tail spermatozoa

Concentration of ejaculated semen (AV) was accessed using Spermacue® (Minitub Ibérica S.L., Tarragona, Spain) and for ejaculates with a concentration reading in the Spermacue®  $\leq 150 \times 10^6$  spermatozoa/mL, the concentration was re-calculated using a Neubauer chamber. Concentration of the recovered epididymal tail spermatozoa was determined using a Neubauer chamber. Progressive motility (PMO) was assessed by light microscopy (200x). The percentage of live sperm cells (Viability) and the percentage of spermatozoa with morphological defects (DEF) were evaluated using light microscopy (1000x) in eosin-nigrosin and Diff-Quick™ stained smears, respectively. A total of 100 sperm cells were evaluated for each parameter.

The motility parameters of frozen-thawed samples (AV, EPI, EPI R, EPI RR) were evaluated using a computer assisted sperm analysis system (ISAS®; Proiser, Valencia, Spain). Five fields per sample were analysed for total motility (TM), straight-line velocity (VSL) and percentage of rapid cells (RAP), using the settings described in Table 1. Viability and DEF of frozen-thawed samples were assessed as described above.

**Table 1.** Settings utilized for computer-assisted semen analysis (ISAS ®).

Characteristic	Units
Number of frames	25/s
Maximum cell size	75 µm
Minimum cell size	4 µm
Velocity of rapid cells	>90 µm/s
Straightness	35%
Temperature	37°C

## Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the software Prism 5 (Graph Pad S. GraphPad prism, version 5.00 edition. San Diego, 2007). An analysis of variance (one way ANOVA) was used to determine differences between experimental groups, followed by post-hoc Tukey test when significant differences were detected ( $p < 0.05$ ). Pearson's correlation coefficients were used to determine the association between testicular and epididymal tail weight, epididymal tail weight and total number of spermatozoa recovered, TM of the ejaculates (AV) and of epididymal (EPI, EPI R and EPI RR) frozen-thawed spermatozoa. Differences were considered significant for  $p < 0.05$ . The data are expressed as mean  $\pm$  standard error (Mean $\pm$ SE).

## Results

### The epididymal sperm characteristics before freezing

No differences were found between the weight of the left ( $13.60 \pm 0.80$  gr) and right ( $14.40 \pm 0.60$  gr) epididymal tail, or between the total number of sperm cells harvested from the left ( $7758 \pm 964.3 \times 10^6$ ) and right ( $8873 \pm 1355 \times 10^6$ ) epididymal tail ( $p > 0.05$ ). The mean testicular and epididymal tail weights obtained in groups EPI and EPI R are presented in Table 2. No differences ( $p > 0.05$ ) were detected for any of these parameters between EPI and EPI R groups. No correlations ( $p > 0.05$ ) were found between testicular and epididymal tail weight, as well as between the total number of sperm cells recovered (Table 3) and the

epididymal tail weight. The mean weight of paired testes was  $340.30 \pm 24.89$  g while the mean number of spermatozoa harvested per stallion was  $16550 \pm 2352 \times 10^6$  ( $5445 \times 10^6$  to  $26005 \times 10^6$ ).

**Table 2** Mean values ( $\pm$  SEM) of testis weight, cauda epididymis weight and total number of spermatozoa recovered in EPI and EPI R groups.

	EPI	EPI R
Testis weight (gr)	$170.5 \pm 14.74$	$169.9 \pm 10.58$
Epididymal tail weight (gr)	$14.14 \pm 0.79$	$13.92 \pm 0.68$

EPI- Testicle processed immediately after castration; EPI R- Testicle processed after 24 h of refrigeration.

In Table 3, the mean values obtained for PMO, Viability and DEF are presented for all experimental groups. After two attempts to obtain an ejaculate by artificial vagina, three out of ten stallions did not ejaculate. Semen of the 7 ejaculates (VA group) had more than 30% PMO and a total number of sperm cells ranging from  $1700 \times 10^6$  to  $9696 \times 10^6$ . The PMO of epididymal spermatozoa samples (EPI, EPI R and EPI RR) varied between 0 and 40%, while the total number of spermatozoa harvested per epididymis varied between  $2370 \times 10^6$  and  $13140 \times 10^6$ . Differences ( $p < 0.05$ ) between experimental groups were found only for PMO (Table 3), with the AV group obtaining the highest ( $p < 0.05$ ) motility, while no differences in PMO were seen among the different groups of epididymal spermatozoa (EPI, EPI R and EPI RR - Table 3).

**Table 3.** Mean ( $\pm$  SEM) total number of spermatozoa collected (Total n° spz) and of percentages of progressive motility (PMO), Viability and of total sperm cells with abnormal morphology (DEF), after spermatozoa collection in the different groups.

	Total n° SPZ ( $10^6$ )	PMO (%)	Viability (%)	DEF (%)
AV (n=7)	6597 $\pm$ 1125	47.86 $\pm$ 4.61 <sup>a</sup>	88.71 $\pm$ 2.86	27.43 $\pm$ 2.96
EPI (n=10)	8520 $\pm$ 1056	15.50 $\pm$ 4.31 <sup>b</sup>	86.60 $\pm$ 1.56	24.50 $\pm$ 2.70
EPI R (n=10)	8036 $\pm$ 1289	15.50 $\pm$ 4.80 <sup>b</sup>	86.40 $\pm$ 2.02	28.5 $\pm$ 3.15
EPI RR (n=8)		25.63 $\pm$ 4.67 <sup>b</sup>	83.50 $\pm$ 3.11	33.75 $\pm$ 2.21

Means in the same column with different superscripts, differ ( $p < 0.05$ ).

AV= ejaculated sperm obtain with artificial vagina; EPI=spermatozoa collected from the epididymal tail immediately after castration; EPI R=spermatozoa collected from the epididymal tail stored for 24 h at 4°C; EPI RR= spermatozoa from the epididymal tail collected immediately after castration and stored for 24 h at 4°C.

### Epididymal sperm quality after freezing

The mean values obtained after cryopreservation for motility parameters (TM, VSL, and RAP), Viability and DEF are presented in Table 4, for all experimental groups. Differences ( $p < 0.05$ ) between experimental groups were only found for percentage of viable sperm cells, with a higher ( $p < 0.05$ ) percentage in the EPI group compared to the AV group, and with no differences detected among the remaining groups.

No correlation ( $p > 0.05$ ) was found between the AV group and the EPI, EPI R and EPI RR groups for the percentage of TM of frozen-thawed spermatozoa.

**Table 4.** Mean ( $\pm$  SEM) percentages of total motile sperm cells (TM), rapid cells (RAP), viable cells (Viability), cells with abnormal morphology (DEF) and mean ( $\pm$  SEM) straight line velocities (VSL).

	TM (%) <sup>*</sup>	RAP (%) <sup>*</sup>	Viability (%)	DEF (%)	VSL ( $\mu$ m/s) <sup>*</sup>
AV (n=7)	34.63 $\pm$ 5.57	2.31 $\pm$ 0.61	63.71 $\pm$ 2.55 <sup>a</sup>	42.71 $\pm$ 2.61	18.24 $\pm$ 0.70
EPI (n=10)	54.10 $\pm$ 4.15	7.04 $\pm$ 1.70	75.60 $\pm$ 2.32 <sup>b</sup>	41.00 $\pm$ 1.72	18.10 $\pm$ 1.36
EPI R (n=10)	40.91 $\pm$ 4.41	3.91 $\pm$ 0.79	73.50 $\pm$ 2.19 <sup>a,b</sup>	40.80 $\pm$ 2.58	17.97 $\pm$ 1.94
EPI RR (n=8)	48.90 $\pm$ 6.62	6.21 $\pm$ 1.56	71.88 $\pm$ 3.69 <sup>a,b</sup>	42.50 $\pm$ 2.49	18.24 $\pm$ 1.12

Means in the same column with different superscripts, differ ( $p < 0.05$ ).

<sup>\*</sup> Computer assessed parameters, with ISAS ®

AV= ejaculated sperm obtain with artificial vagina; EPI=spermatozoa from the epididymal tail collected immediately after castration; EPI R=spermatozoa collected from the epididymal tails stored for 24 h at 4°C; EPI RR= spermatozoa from the epididymal tail collected immediately after castration and stored for 24 h at 4°C.

## Discussion

Novice and even experienced stallions can exhibit differences in their response to semen collection with artificial vagina, reflecting preferences or aversions to specific characteristics of this collection technique (McDonnell, 2011). In the present study 3 out of 10 healthy stallions did not ejaculate suggesting that more attempts using different settings of the artificial vagina (temperature, inner pressure, gel and others) or a different mare in heat might have been needed to obtain an ejaculate.

To our knowledge, data on weights of left and right epididymal tail have not been reported before, as opposed to testicular weights where differences have been detected (Johnson and Thompson, 1986). The lack of weight differences ( $p > 0.05$ ) between right and left epididymis found in this study is in agreement with the similar number of sperm cells obtained from right and left epididymis, indicating that both epididymal tails have the same storing ability.

No differences ( $p > 0.05$ ) were found between EPI and EPI R groups in regard to testis and epididymal tail weight. The mean weight of paired testes was similar to that reported by Pickett *et al.* (1989), 329  $\pm$  104 g, but the mean weight per testis was lower than that obtained by James *et al.* (2002), 231  $\pm$  0.01 g. These variations can probably be due to differences in age, breed of the stallions



and season (breeding/non breeding). In fact, it has been reported that stallions, on average, have seasonal variation of up to 17% in size for the same testis, and that older stallions have in average larger testis than young stallions (Pickett *et al.*, 1989).

The epididymal tail weight obtained in this study was almost twice the weight  $7.80 \pm 0.60$  g reported by James *et al.* (2002). However, it is not clear if in that study the epididymal tail was weighted before or after the dissection of the connective tissue and fascias.

The total numbers of spermatozoa recovered per individual epididymal tail (EPI-  $8520 \pm 1056 \times 10^6$ ; EPI R-  $8036 \pm 1289 \times 10^6$ ) were slightly higher than  $5565 \pm 1008 \times 10^6$  reported by James *et al.* (2002), but lower than  $12.90 \pm 9.20 \times 10^6$  obtained by Monteiro *et al.* (2011b). Nonetheless, the total epididymal sperm obtained for both epididymal tails was similar to those, 15 to 25 billion sperm cells, reported by Bruemmer (2006), and similar to what has been reported by Monteiro *et al.* (2011b). As expected, the total spermatozoa recovered from both epididymides was higher ( $p < 0.05$ ) than the sperm count from one ejaculate from the same stallions using an artificial vagina (AV Group), which is in agreement with previous findings (Monteiro *et al.*, 2011b).

In contrast to previous reports (James *et al.*, 2002), the weight of the cauda epididymis did not correlate ( $p > 0.05$ ) with the number of sperm harvested per epididymal tail or with the testicle weight, indicating that in these animals the epididymal tail weight was not directly related to the total number of spermatozoa recovered or to the testis weight. In agreement with Monteiro *et al.* (2011b), no differences were found between the total number of spermatozoa collected from the epididymal tail (EPI) immediately after castration or after 24 hrs of refrigeration of the organ, for the same stallion (EPI R).

Before cryopreservation, differences between experimental groups were only observed for PMO. As expected, a lower percentage of PMO was observed in the epididymal groups (EPI, EPI R and EPI RR) than in the AV group. In addition, and similarly to findings by others (Neild *et al.*, 2006), immediately after collection some epididymal sperm suspensions did not have forward progressive motility, but after processing and freeze-thawing the percentage of sperm cells with forward motility increased. This is due to the existence a motility inhibiting factors in the epididymis that keep sperm cells in an immotile and metabolic quiescent state

(Usselman and Cone, 1983). Conversely, after ejaculation, spermatozoa are diluted in seminal plasma, and epididymal sperm suspensions processed for cryopreservation are centrifuged and re-diluted in a cryoextender, allowing the elimination or dilution of these inhibiting factors (Turner and Reich, 1985).

In the present study no differences were observed in the sperm cells defects (DEF) and Viability between ejaculated and epididymal sperm cells in agreement with Monteiro *et al.* (2011b). But Heise *et al.* (2011) reported a higher percentage of abnormalities and higher percentage of viable sperm cells in the epididymal tail (Heise *et al.*, 2011). The difference in viability could be attributed to alterations occurring in the plasma membrane of ejaculated sperm when in contact with seminal plasma, which could affect sperm viability (Johnson *et al.*, 1980), but a solid explanation for the difference in sperm abnormalities remains to be given. Additional research on viability and DEF between ejaculated and epididymal sperm cells is warranted, given the contradictory results obtained by different authors.

A strong association between the total motility of frozen-thawed ejaculated and frozen-thawed epididymal sperm was reported by Magistrini *et al.* (1988). In the present study, no such correlation ( $p>0.05$ ) was detected.

After freezing/thawing, no differences between experimental groups were observed for all the motility parameters assessed, as well as for the percentage of morphological defects recorded. Still, a higher percentage of viable spermatozoa was observed in the EPI group than in the VA group which could be due to a higher resistance to cold shock of epididymal rather than ejaculated sperm (Johnson *et al.*, 1980; Monteiro *et al.*, 2011a; Monteiro *et al.*, 2011b).

For all parameters (TM, VSL, RAP, DEF and viability) evaluated in frozen/thawed samples the EPI R group did not differ from the EPI and AV groups, which is in agreement with others results (Bruemmer *et al.*, 2002; Monteiro *et al.*, 2011b), indicating that 24 hour refrigeration of epididymal sperm within the epididymal tail (EPI R) does not affect cryopreservation.

In this study we also demonstrated, for the first time in the stallion, that cold preservation of extended epididymal sperm for 24 hours before freezing was neither deleterious nor beneficial for the quality of the frozen-thawed semen as compared to the other experimental groups.

The same fertility was obtained with epididymal sperm cells cryopreserved immediately after castration or after 24 h of refrigeration of the epididymis, and for both cases the fertility was equivalent to the one obtained with cryopreserved ejaculated sperm (Monteiro *et al.*, 2011b). In the present study, the comparative fertilizing ability of frozen-thawed epididymal sperm diluted and stored at 4° for 24 hours before freezing remains to be tested.

## **Conclusions**

The immediate collection and refrigeration of epididymal spermatozoa was as efficient as the refrigeration of the testis-epididymis complex. Thus, the choice of either method to ship epididymal sperm cells for cryopreservation will depend on the operator preferences. The present study also showed that both right and left epididymal tails had a similar weight and number of stored sperm cells.

## **Acknowledgement**

This work was partially financed by Projects PTDC/CVT/108456/2008 (FCT) and COMPETE:FCOMP-01-0124-FEDER-009565 (FEDER).

## **References**

- Bruemmer JE, Reger H, Zibinski EL, Squires EL. 2002. Effect of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, **58**: 405-407.
- Bruemmer JE. 2006. Collection and freezing of epididymal stallion sperm. *Veterinary Clinic of North America Equine Practice*, **3**: 677-682.
- Caballero J, Frenette, Sullivan R. 2011. Post testicular sperm maturational changes in the bull: important role of the epididymosomes and prostasomes. *Veterinary Medicine International*, ID 757194.
- Heise A, Thompson PN, Gerber D. 2011. Influence of seminal plasma on fresh and post-thaw parameters of stallion epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, **123**: 192-201

- James AN, Green H, Hoffman S, Landry AM, Paccamonti D, Godke RA. 2002. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4°C for 24, 48, 72 and 96h. *Theriogenology*, **58**: 401-404.
- Johnson L, Amann RP, Pickett BW. 1980. Maturation of equine spermatozoa. *American Journal of Veterinary Research*, **41**: 1190-1196.
- Johnson L, Thompson DL. 1986. Seasonal variation in the total volume of Leydig cells in stallions is explained by variation in cell number rather than cell size. *Biology Reproduction*, **35**: 971-979.
- Magistrini M, Tinel C, Noue P, Palmer E. 1988. Correlations between characteristics of frozen spermatozoa from ejaculates or perfusates from cauda epididymes and proximal deferent duct in a group of stallions. In: University College Dublin (ed), 11<sup>th</sup> *International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*. University College Dublin UK, pp: 273.
- McDonnel S. 2011. Abnormal sexual behaviour. In: Mckinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD (eds), *Equine reproduction*, 2nd edn. Wiley-Blackwell, Chichester, UK, pp: 1407.
- Monteiro GA, Freitas-Dell'Aqua CP, Guasti PN, Landim-Alvarenga FC, Dell'Aqua Junior JA, Alvarenga MA, Papa FO. 2011a. Comparison of apoptotic index between cryopreserved ejaculated and epididymal sperm in stallions. In: AAEP (ed), 57<sup>th</sup> *Annual Convention of American Association of Equine Practicioners*, San Antonio, pp: 226.
- Monteiro GA, Papa FO, Zahn FS, Dellaqua JA, Melo CM, Maziero RRD, Avanzi BR, Alvarenga MA, Guasti PN. 2011b. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, **127**: 197-201.
- Muradás PR, Weiss RR, Kozicki, LE, Granemann LC, Santos IW, Pimpão CT. 2006. Some viability parameters from equine spermatozoa harvested by artificial vagina and epididymal tail washing. *Archives of Veterinary Science*. **11**: 69-74.
- Neil D, Miragaya M, Chaves G, Pinto M, Alonso A, Gambarotta M, Losinno L, Agüero A. 2006. Cryopreservation of cauda epididymis spermatozoa from slaughterhouse testicles 24h after ground transportation. *Animal Reproduction Science*, **94**: 92-95.

- Pickett BW, Amann RP, McKinnon AO, Squires EL, Voss JL. 1989. Management of the stallion for maximum reproductive efficiency II. In: Colorado State University (ed), *Animal Reproduction Laboratory Bulletin n°5*, Colorado State University, pp: 59-65.
- Sostaric E, Aalberts M, Gadella BM, Stout TAE. 2008. The roles of the epididymis and prostasomes in attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, **107**: 237-48.
- Tiplady C, Morris LHA, Allen WR. 2001. Stallion epididymal spermatozoa: pre-freezing and post thaw motility and viability after 3 treatments. *Havemeyer Foundation Monography Series*, **5**: 63-65.
- Turner TT, Reich GW. 1985. Cauda epididymal sperm motility: a comparison among five species. *Biology Reproduction*, **32**: 120-128.
- Usselman MC, Cone RA. 1983. Rat sperm are mechanically immobilised in the cauda epididymis by immobilin, a high molecular weight glycoprotein. *Biology Reproduction*, **29**: 1241-1253.

# **Discussão Geral e Perspectivas Futuras**

Na génese desta tese estiveram os desafios originados pela prática reprodutiva clínica do Centro de Reprodução Animal de Vairão (CRAV). O objectivo central destes trabalhos de investigação foi o de otimizar algumas técnicas de reprodução assistida (TRA's) em equinos, especialmente aquelas com maior aplicação prática clínica, bem como adquirir novas TRA's requisitadas pela indústria equina. Em qualquer centro de reprodução assistida de equinos, o trabalho baseia-se essencialmente na aplicação de duas técnicas fundamentais: a monitorização ecográfica do aparelho reprodutivo da égua, e a recolha e processamento de sémen do garanhão. Todas as outras TRA's gravitam em redor destas técnicas basilares, individualmente ou em conjunto. Isto aplica-se a inseminação artificial (IA), refrigeração/criopreservação de sémen, selecção de sub-populações de espermatozóides, sendo também essencial na aplicação de técnicas mais complexas como a recolha e criopreservação das reservas extra-gonadais, colheita e transferência de embriões (TE), transferência de gâmetas (GIFT) e injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI).

A aplicação das TRA's requer, para além do trabalho de campo em contacto directo com os animais, a aplicação de técnicas de processamento de sémen ou de manipulação de embriões em laboratório. O carácter "sujo" ou contaminado do trabalho de campo, a proximidade física entre os animais e laboratório, e a elevada carga bacteriana da genitália externa dos garanhões condicionam o grau de assepsia laboratorial. Assim, o objectivo neste tipo de laboratórios é ter um ambiente com a menor carga contaminante possível, visto que a eliminação total dos microorganismos do ambiente de trabalho e das amostras não é exequível em situações reais de trabalho. Este facto adquire relevância particular quando sabemos que os efeitos dos microorganismos sobre o sucesso das técnicas de reprodução assistida em equinos estão insuficientemente investigados, e que de acordo com Leblanc e Causey (2009) as infecções bacterianas uterinas após aplicação de técnicas reprodutivas, afectam 25-60% das éguas que não ficam prenhas.

A genitália externa do garanhão está contaminada por uma microflora variada, composta maioritariamente por bactérias não patogénicas, algumas potencialmente patogénicas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus equi zooepidemicus*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*) e fungos (Madsen e Christensen, 1995; Malmgren *et al.*, 1998; Rota *et al.*, 2011).

Durante a recolha de sémen com vagina artificial é impossível evitar a contaminação do ejaculado por estes microorganismos (Aurich e Spergser 2007). Apesar da existência de poucos estudos, há algumas descrições da microflora presente no sémen fresco (Madsen *et al.*, 1995; Malmgren *et al.*, 1998; Varner *et al.*, 1998), refrigerado (Aurich e Spergser, 2007; Varner *et al.*, 1998) e no sémen criopreservado (Corona e Cherchi, 2009; Ortega-Ferrusola *et al.*, 2009) do garanhão. Após cobertura natural ou IA, parte das bactérias presentes no pénis e sémen irão ser inoculadas no útero (Samper e Tibary, 2006). A égua encontra-se adaptada a esta realidade, possuindo uma série de mecanismos físicos e imunológicos (Lu e Morrissey, 2006) que defendem o aparelho reprodutivo contra a colonização microbiológica. No entanto, bactérias potencialmente patogénicas são capazes de induzir patologias uterinas (endometrites) em éguas susceptíveis (Hughes e Loy, 1975; Malmgren *et al.*, 1998; Samper e Tibary, 2006).

A casuística do CRAV expôs-nos a uma indelével realidade: a existência de proprietários de garanhões valiosos mas portadores de bactérias potencialmente patogénicas, que querem obter gestações (por IA ou monta natural) em éguas susceptíveis. Assim, nos primeiros três artigos desta tese possuem um fio condutor que são as bactérias, especialmente as potencialmente patogénicas, presentes na genitália externa e no sémen (fresco/refrigerado/criopreservado) do garanhão.

Sabe-se que a localização geográfica e o ambiente podem afectar a flora de genitália (Madsen e Christensen, 1995). Deste modo, uma das tarefas primordiais, era a determinação da variada microflora comensal presente na genitália externa dos garanhões. Esta informação é importante, não só na descrição da lista de microorganismos comensais existentes, mas também no reconhecimento do que é uma microflora comensal “espectável” para as nossas condições ambientais.

No primeiro Capítulo, observamos que o microorganismo com frequência de isolamento mais alto na genitália externa, sémen fresco e pele foi as leveduras (79.7-93.5%, 91.3% e 93.5% respectivamente). Adicionalmente, no Capítulo 2, a frequência de isolamento no sémen criopreservado foi igualmente alta, 65%. A descrição de isolamento de fungos/leveduras da genitália externa do garanhão é relativamente escassa. Alguns autores identificam algumas espécies de fungos como comensais; *Aspergillus fumigatus* (Bristol, 1991) e *Mucor* spp. (Malmgren *et*



*al.*, 1998), mas não quantificam a sua frequência de isolamento. Os nossos resultados são muito diferentes dos obtidos por Rota *et al.* (2011), que só isolaram leveduras em 24.2% das amostras da fossa uretral. Esta diferença poderia indicar que os locais onde se encontram os garanhões por nós investigados possuem cargas contaminantes de leveduras ambientais superiores aos locais estudados por outros autores. Esta possibilidade parece-nos no entanto pouco verosímil, pois a elevada percentagem de isolamentos de leveduras foi constante entre todos os locais estudados – desde o seco Alentejo ao húmido Entre-Douro-e-Minho. Outra possibilidade seria que a higiene em todos os diferentes centros de onde se colheram amostras ser de fraca qualidade. No entanto, os dados também não apoiam esta conclusão, já que as cargas microbianas totais encontradas no nosso trabalho (Capítulo 2) são inferiores às detectadas por outros autores (Corona e Cherchi, 2009; Najjar *et al.*, 2010; Ortega-Ferrusola *et al.*, 2009) e, ao contrário dos outros estudos, manipulamos o sêmen em câmara de fluxo laminar. Assim, especulamos que dado o facto de a endometrite por fungos ter uma incidência muito menor (1 to 5%) que a endometrite induzida por bactérias (Coutinho e Alvarenga, 2011), não se tem efectuado um esforço dirigido para o isolamento de fungos, o que pode ter subestimado a frequência de isolamento de leveduras na genitália dos garanhões. Dado estes resultados contraditórios, consideramos que deveriam ser feitos estudos adicionais sobre a prevalência de fungos na genitália de equinos e sobre o seu potencial efeito na eficiência reprodutiva e patologia uterina.

A *Corynebacterium* spp. e o *Staphylococcus* coagulase-negativo foram as espécies bacterianas com frequências de isolamento mais altas na genitália externa da população total de garanhões investigados (respectivamente 71.9% e 61.0%), o que está em concordância com o descrito na literatura (Bristol, 1991). Estas bactérias não são consideradas patogénicas e são bactérias típicas da pele (Madsen e Christensen, 1995; Zubrod *et al.*, 2004). As leveduras, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* coagulase-negativo, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Bacillus* spp. e *Acinetobacter* spp. foram isoladas em mais de 10% dos indivíduos da população total de garanhões, sugerindo que estas representam a microflora típica dos garanhões nos locais estudados.

A microflora bacteriana potencialmente patogénica isolada no primeiro trabalho da tese, e concordante com a descrita na literatura (Samper e Tibary,

2006), foi a *Pseudomonas aeruginosa* (7.8%), a *Klebsiella pneumoniae* (4.7%), o *Streptococcus zooepidemicus* (1.7%), o *Staphylococcus aureus* (3.4%), e a *Escherichia coli* (18.8%). As bactérias com efeitos deletérios na refrigeração de sêmen equino (Aurich e Spergser 2007), como a *Pseudomonas aeruginosa* (7.8%) e *Strep. dysgalactiae equisimilis* (3.4%), foram também isoladas na genitália externa dos garanhões investigados. Todas estas foram isoladas em frequências relativamente baixas, excluindo a *Escherichia coli*, uma habitante comensal do aparelho gastrointestinal e contaminante frequente das camas dos cavalos.

A prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* encontrada noutros estudos é muito variável: Hughes e Loy (1975) isolaram *Ps. aeruginosa* em 36% da amostragem e *K. pneumoniae* não foi isolada; Malmgren *et al.* (1998) reportou 12.5% de *Ps. aeruginosa* e 6.3% de *K. pneumoniae*; enquanto Rota *et al.* (2011) não isolou nenhuma das duas bactérias. Há descrições prévias de *Staph. aureus* (Bristol, 1991; Samper e Tibary 2006), mas acreditamos que a prevalência desta bactéria (3.4%) foi determinada pela primeira vez no nosso estudo. Apesar de nós só termos encontrado *Streptococcus zooepidemicus* num garanhão (1.7%), Cerny *et al.* (2012) obtiveram uma frequência de isolamentos de 11.4% em 201 recolhas microbiológicas da uretra distal, executadas em 15 garanhões após cobrição natural.

Os estudos realizados por outros autores relativos à microflora comensal da genitália externa do garanhão dizem respeito apenas a machos utilizados em reprodução (para cobrição natural e/ou recolha de sêmen). No nosso trabalho incluímos garanhões inteiros sem história reprodutiva, com intuito de obtermos uma amostra mais representativa possível da população geral e para averiguar o efeito da actividade reprodutiva na população microbiana da genitália. Os resultados mostraram diferenças, nunca antes reportadas, na microflora da genitália externa entre estas duas subpopulações: a quantidade de diferentes tipos de bactérias presentes nos garanhões reprodutores foi numericamente superior relativamente aos não reprodutores (27 e 15, respectivamente), e as bactérias consideradas potencialmente patogénicas foram encontradas exclusivamente (exceptuando a *E. coli*) no grupo dos garanhões reprodutores. Em relação a este último aspecto é necessário ter em consideração que o número de amostras recolhidas em garanhões reprodutores foi consideravelmente maior do

que em garanhões não reprodutores (41 *versus* 18), o que pode ter influenciado os resultados, em particular para as bactérias isoladas em baixas frequências.

Os critérios de selecção de garanhões reprodutores são, entre outros, a “performance” e o palmarés desportivo (Colenbrander *et al.*, 2003). Apesar dos garanhões reprodutores partilharem frequentemente as mesmas instalações com garanhões não reprodutores, os primeiros são expostos com uma maior frequência a transportes para concursos hípicas/centros clínicos veterinários, a éguas, a vaginas artificiais e são sujeitos a manipulações da genitália, o que poderá explicar o maior número de espécies isoladas neste grupo.

A *Ps. aeruginosa* e a *K. pneumoniae* são considerados agentes ambientais presentes na água e instalações hípicas (Malmgren *et al.*, 1998), e o *Streptococcus zooepidemicus* é um habitante comensal da mucosa respiratória dos equinos (Erol *et al.*, 2012), pelo que seria expectável encontrar estas três espécies na genitália externa dos garanhões não reprodutores. Estas três bactérias, estão identificadas no grupo das maiores causadoras de endometrites em éguas (Frontoso *et al.*, 2008), mas foram também isoladas do clítoris de éguas clinicamente saudáveis (Hinrichs *et al.*, 1988), levantando a possibilidade da transmissão venérea por cobrição natural ter um papel mais relevante na contaminação da genitália externa de garanhões reprodutores, do que a contaminação ambiental.

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria cuja via de transmissão é o contacto directo, por norma através de portadores humanos, e que desaparece do ambiente em cerca de 8 semanas (Pettersen *et al.*, 2012). Apesar do *Staphylococcus aureus* também fazer parte do grupo de bactérias que são frequentemente isoladas do útero em éguas com endometrite (Frontoso *et al.*, 2008) esta espécie não faz parte da flora comensal do clítoris de éguas saudáveis (Hinrichs *et al.*, 1988). Assim, a presença exclusiva do *Staphylococcus aureus* em garanhões reprodutores, consubstancia a hipótese de que os veterinários e tratadores serão a fonte de contaminação durante a manipulação da genitália externa através da execução de técnicas de reprodução assistida (montagem da vagina artificial, lavagem do pénis, colheita de sémen com VA, manipulação do sémen e mesmo durante a recolha de amostras microbiológicas) (Madsen e Christensen, 1995; Samper e Tibary, 2006). Seria importante a elaboração de estudos que permitissem confirmar se o genótipo das bactérias isoladas no

garanhão é o mesmo que o das bactérias isoladas em éguas com endometrite, confirmando a sua patogénese. Os estudos teriam que incluir amostragens mais homogêneas entre as subpopulações, a inclusão de isolamentos microbiológicos da genitália e útero das éguas antes e após aplicação das TRA's bem como a genotipagem das estirpes bacterianas isoladas na genitália e sêmen do garanhão e na vagina, clitóris e útero da égua, visto que num estudo recente (Rasmussen *et al.*, 2013) se verificou que as estirpes bacterianas presentes na vagina e no clitóris eram distintas das bactérias isoladas no útero das mesmas éguas com endometrites clínicas.

Apesar de não ser considerado potencialmente patogénico, o *Strep. dysgalactiae equisimilis* possui efeitos deletérios sobre o sêmen (Aurich e Spengler, 2007). Considerou-se que o aparelho reprodutivo da égua era a fonte/reservatório desta espécie, e que o garanhão seria positivo apenas durante os meses de reprodução (Madsen e Christensen, 1995). No entanto o isolamento desta bactéria nos garanhões não reprodutores (5.6%) demonstrou que tal afirmação não parece ser correcta.

As bactérias isoladas com mais frequência nos úteros de éguas com endometrites clínicas são as consideradas potencialmente patogénicas (Frontoso *et al.*, 2008), sendo que as infecções endometriais ocorrem em 20 a 60% das éguas que não ficam gestantes, causando elevadas perdas económicas (Davis *et al.*, 2013). Assim, os resultados na experiência 1 (Capítulo 1) vieram enfatizar a necessidade de executar microbiologias da genitália externa antes de iniciar a época reprodutiva.

A investigação rotineira da microflora comensal do garanhão reprodutor (para identificação dos portadores de bactérias potencialmente patogénicas) e a informação dos proprietários das éguas dos riscos de contaminação das diferentes técnicas de reprodução assistida (IA vs monta natural) devem fazer parte das boas práticas veterinárias. Para além dos efeitos sanitários, temos de ter em conta o elevado custo económico que as endometrites provocam (Davis *et al.*, 2013; Leblanc e Causey, 2009) por falhas reprodutivas e custos veterinários. Assim, a pesquisa rotineira da flora comensal do aparelho reprodutivo das éguas deverá ser feita sempre que a monta natural venha a ser utilizada.

Os garanhões devem ser portadores de uma população mista de bactérias, não patogénica. O perfil desta população foi por nós definido para os garanhões

mantidos no ambiente estudado. O isolamento de culturas puras será indicativo de uma disbiose da microflora da genitália externa. Na nossa prática clínica, o único caso que encontramos foi o de um garanhão com apenas duas espécies de bactérias isoladas da genitália, *Rhodococcus equi* e *Corynebacterium* spp. (Rocha *et al.*, 2012), atribuível provavelmente ao tratamento muito prolongado com antibióticos efectuado pelo veterinário referente.

Fica também vincada a necessidade do seguimento de protocolos sanitários rígidos por parte dos veterinários/tratadores (utilização de luvas entre outras) durante manipulações da genitália externa, diminuindo a possibilidade do veterinário/tratador ser um vector da contaminação.

A microflora encontrada no sémen dos garanhões (experiência 2, Capítulo 1) foi muito similar à da genitália externa. Observamos que os microorganismos presentes com frequências de isolamento superiores a 15% (leveduras, *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase-negativo, *Corynebacterium* spp., *Acinetobacter* spp. e *Bacillus* spp.) existiam quer na genitália quer no sémen. Dezanove espécies foram isoladas no sémen e na genitália, sendo que apenas 3 tipos de microorganismos foram isolados exclusivamente da genitália (*K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e fungos filamentosos) e só uma espécie foi exclusiva do sémen (*Salmonella* spp). Todas as bactérias potencialmente patogénicas foram isoladas do sémen com excepção da *K. pneumoniae*, mas a presença desta bactéria no sémen já está documentada noutros estudos (Madsen e Christensen, 1995; Malmgren *et al.*, 1998).

O facto de haver espécies isoladas exclusivamente na genitália externa ou isoladas com menor frequência no sémen em comparação com a genitália, pode ser explicado pelo efeito diluidor do plasma seminal. Por outro lado, a presença exclusiva da *Salmonella* spp. no sémen, bem como o facto de termos encontrado bactérias no sémen em 7 garanhões que não foram isoladas da genitália externa dos mesmos, demonstra a eventualidade de contaminação do sémen através da manipulação pelos operadores, já postulada anteriormente (Madsen e Christensen, 1995).

Encontramos apenas um garanhão portador de *Ps. aeruginosa* na genitália externa sem que a mesma fosse isolada do sémen (Capítulo 3), mas outras bactérias potencialmente patogénicas, tal com *Staph. aureus*, *Strep. zooepidemicus*, *Ps. aeruginosa* and *E. coli* (Malmgren *et al.*, 1998), bem como

espécies capazes de induzir efeitos deletérios no sémen (Aurich and Spargser, 2007), nomeadamente *Strep. dysgalactiae equisimilis* e *Ps. aeruginosa*, estavam presentes na genitália e no sémen (Capítulo 1, experiência 2). Assim fica reforçada a importância de analisar a microflora comensal dos garanhões reprodutores (genitália externa e sémen) antes da época reprodutiva. Refira-se que essa prática é negligenciada. Nos centros de reprodução de equinos em Portugal não se pesquisa o conteúdo microbiano da genitália externa dos garanhões por rotina, com a excepção da *Taylorella equigenitalis*, agente da Metrite Contagiosa, enfermidade de declaração obrigatória à Organização Mundial de Saúde (O.I.E) e só nos casos em que a regulamentação internacional o exige, nomeadamente para exportação de sémen.

Sabendo quem são os garanhões portadores destas bactérias potencialmente patogénicas, podemos tomar decisões críticas de forma a evitar ou diminuir a probabilidade de transmissão. De acordo com Samper e Tibary (2006) e com os nossos resultados do Capítulo 3, sugerimos a IA como o método de menor risco de transmissão de bactérias potencialmente patogénicas. Com base nesta informação, podemos desaconselhar os proprietários de éguas susceptíveis a usarem cobrição natural com garanhões portadores e a optar por IA com técnicas de contaminação mínima (Kenney *et al.*, 1975), ou em última análise garantir que os proprietários das éguas tomam as suas decisões em consciência plena das possíveis consequências e com acesso a toda a informação sanitária do garanhão.

As recolhas de amostras microbiológicas da uretra distal/fossa uretral/prepúcio do garanhão exigem que este seja rufiado de modo a que o pénis fique erecto. Durante recolha, existe sempre um risco de lesão do veterinário, devido ao carácter irascível de alguns garanhões. Na experiência 3 (Capítulo 1), a pesquisa e comparação da microflora da genitália externa com a pele do abdómen (que contacta com o pénis quando este está erecto), pretendia essencialmente saber se as espécies potencialmente patogénicas isoladas eram idênticas em ambos os locais, possibilitando a recolha de amostras microbiológicas de uma forma mais segura. Do grupo das bactérias potencialmente patogénicas (*E. coli*, *Staph. aureus*, *K. pneumoniae* e *Ps. aeruginosa*) e das bactérias com efeitos potencialmente deletérios na refrigeração de sémen (*Ps. aeruginosa* e *Strep. dysgalactiae equisimilis*), apenas foi isolada na

pele/pelo do abdómen a *E. coli*, muito provavelmente por contaminação fecal ambiental. Podemos aferir então que as bactérias isoladas da pele do abdómen (que contacta com o pénis erecto), não são indicativas da microflora potencialmente patogénica presente na genitália externa (excluindo a *E. coli*), mas talvez mais importante é sabermos que esta área não funciona como reservatório destas, dado importante quando o veterinário decide fazer tratamento/lavagens tópicas do pénis em garanhões portadores de bactérias potencialmente patogénicas.

Para além das preocupações sanitárias em relação às éguas susceptíveis (Hughes e Loy, 1975; Malmgren *et al.*, 1998; Samper e Tibary, 2006), a presença de bactérias no sémen do garanhão pode ter efeitos deletérios sobre as células espermáticas, nomeadamente no que diz respeito à resistência à criopreservação (Hoogewijs *et al.*, 2011). Está descrita uma grande variabilidade na resistência à criopreservação de sémen de garanhão, estima-se que 20% dos garanhões produzem sémen que congela “bem”, 60% congela de “forma aceitável” e 20% congela “mal” (Kuisma *et al.*, 2006; Loomis e Graham, 2008; Vidament *et al.*, 1997). Os mecanismos subjacentes a esta variabilidade estão pouco elucidados (Sieme *et al.*, 2008). As diferenças poderão ser atribuídas a factores genéticos (Allen, 2005; Sieme *et al.*, 2008), aos diferentes crioprotectores presentes nos meios de congelação (Allen, 2005; Alvarenga *et al.*, 2005) e a outros factores ainda não investigados (Sieme *et al.*, 2008). Recentemente, Hoogewijs *et al.*, (2011) postularam que as bactérias também poderão influenciar esta variação na criosensibilidade, especialmente no caso dos reprodutores cujos ejaculados frescos possuem baixas motilidades progressivas. Em humanos sabe-se que as bactérias possuem a capacidade de aderir aos espermatozóides, diminuindo a sua motilidade (El-Bahrawy *et al.*, 2010).

No Capítulo 2 testamos o método de selecção espermática (Androcoll-E), como “filtro” de bactérias no sémen fresco, antes da criopreservação. O Androcoll-P (coloide específico para sémen de porco) já tinha sido utilizado como “filtro” de bactérias em sémen de suínos, com resultados promissores (Morrell e Wallgren, 2011). Na nossa experiência este tratamento não eliminou, mas diminuiu a microflora existente no sémen criopreservado, e as espécies isoladas no sémen descongelado do grupo controlo (C) e grupo tratado com Androcoll-E (SLC) eram similares entre si e também às previamente encontradas no pénis e sémen fresco

(Capítulo 1). De facto os microorganismos com frequências de isolamento >45% em ambos os grupos (C e SLC), *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp., *Staph. coagulase negativo*, *Corynebacterium* spp. e leveduras, estão entre as espécies mais frequentemente encontradas na genitália externa dos garanhões na área geográfica estudada (Capítulo 1).

Em 5 garanhões foram isolados microorganismos no grupo tratado com Androcoll-E, que não estavam presentes no grupo controlo, consubstanciando a hipótese de contaminações de amostras por parte dos operadores, apesar de medidas de assepsia consideráveis terem sido adoptadas durante o desenvolvimento da experiência.

Embora o tratamento (Androcoll-E) não tenha eliminado as bactérias, ele obteve uma carga microbiana total (TML) 43% inferior. Em relação às espécies com maior prevalência, o tratamento apenas diminuiu ( $p < 0.05$ ) a carga microbiana de *Enterococcus* spp. e *Bacillus* spp.. Recentemente Morrell *et al.* (2014) reportaram que a aplicação deste método de selecção espermática (Androcoll-E) em ejaculados frescos de garanhão contaminados *in vitro* com quantidades conhecidas de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Strep. zooepidemicus* e *Taylorella equigenitalis* removeu respectivamente 97%, 93%, 93% e 81% das bactérias adicionadas. Apesar de creermos ser o único estudo que testa o efeito de “filtrador” do Androcoll-E em sémen criopreservado de garanhão, este não pode ser directamente comparado pois teve um desenho radicalmente experimental distinto.

No estudo de Morrell *et al.* (2014), focaram-se em espécies bacterianas potencial ou verdadeiramente patogénicas, adicionando genótipos destas *in vitro* muito provavelmente menos adaptados ao sémen de garanhão, quando comparados com os microorganismos isolados do próprio sémen criopreservado (o caso da nossa experiência). Neste estudo, não isolamos bactérias potencialmente patogénicas (*E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Strep. zooepidemicus* e *Staphylococcus aureus*), nem bactérias com potenciais efeitos deletérios sobre os parâmetros seminais durante a refrigeração (*Ps. aeruginosa* e *Streptococcus dysgalactiae equisimilis*). Assim serão necessários estudos adicionais para determinar se a diminuição de TML obtida no grupo tratado com Androcoll-E possui algum efeito em sémen portador de bactérias potencialmente patogénicas ou com efeitos deletérios nos parâmetros espermáticos durante a



refrigeração. No entanto, observamos no grupo tratado com Androcoll-E uma diminuição ( $p < 0.05$ ) de duas espécies comensais não patogênicas (*Enterococcus* spp. e *Bacillus* spp.).

De acordo com os nossos resultados, não foi observada qualquer correlação ( $p > 0.05$ ) entre a TML e os parâmetros de cinética espermática em ambos os grupos. Visto haver uma grande variabilidade nas cargas contaminantes em sémen criopreservado do garanhão (Corona e Cherchi, 2009; Najjar *et al.*, 2010; Ortega-Ferrusola *et al.*, 2008), devemos enfatizar que a ausência de correlação observada entre TML e parâmetros cinéticos das células espermáticas apenas diz respeito aos intervalos de TML por nós encontrados e para as espécies isoladas neste estudo, sendo necessária informação adicional para diferentes espécies de microorganismos e para cargas contaminantes distintas.

Tem sido sugerido que ejaculados de garanhões que possuam motilidades progressivas pós-descongelção  $< 30\%$  deveriam ser considerados como não utilizáveis em programas reprodutivos comerciais (Loomis e Graham, 2008). Este critério é altamente discutível, já que o sémen de alguns garanhões muito requisitados não produzem ejaculados frescos com  $\geq 30\%$  de motilidade progressiva, não está estabelecida uma correlação entre a motilidade progressiva pós-descongelção e a fertilidade, e porque os factores que afectam a fertilidade após IA com sémen criopreservado são múltiplos (qualidade do sémen, método de criopreservação, crioprotector utilizado no sémen, nº espermatozóides móveis por dose, “timing” da IA, manejo reprodutivo da égua pós IA, e outros) (Kuisma *et al.*, 2006).

Quando as motilidades progressivas pós-descongelção são inferiores aos tais 30%, não quer dizer que estejamos, exclusivamente, perante sémen de garanhão pouco resistente à criopreservação. Por exemplo, um sémen que possui imediatamente após a recolha uma motilidade progressiva de 30%, pode ter uma motilidade progressiva após criopreservação/descongelção de 30%, que neste caso faria deste sémen um “bom” congelador. Apesar desta complexidade de conceitos, curiosamente quando dividimos as amostras em 2 grupos, motilidade total pós-descongelção  $> 30\%$  e motilidade total pós-descongelção  $< 30\%$ , observamos que as diferenças ( $p < 0.05$ ) de TML entre grupos controlo e tratado, apenas ocorrem para os ejaculados com  $> 30\%$  de motilidade. Estes resultados

são de difícil interpretação, pois como já referido, a variabilidade de resistência à criopreservação de sémen de garanhões é devida a múltiplos e complexos factores. No entanto, os resultados parecem sugerir que existe uma associação entre a carga de microorganismos e a capacidade da centrifugação em monocamada remover os microorganismos, quando os ejaculados possuem grandes percentagens de espermatozóides mortos ou danificados. Para clarificar esta hipotética associação serão necessários estudos mais aprofundados.

Inicialmente, o Androcoll-E foi especificamente desenvolvido como um protocolo de selecção espermática capaz de seleccionar os espermatozóides com as melhores características seminais (motilidade, viabilidade e integridade da cromatina) melhorando a evolução destes parâmetros durante o armazenamento refrigerado do sémen (Johannisson *et al.*, 2009). Quando começamos a utilizar o Androcoll-E, confirmámos os efeitos positivos da centrifugação isopícnica do sémen com este produto na motilidade progressiva e na percentagem de espermatozóides vivos com acrossoma intacto durante 72 horas de refrigeração (Costa *et al.*, 2012), mas não observamos melhoria ( $p > 0.05$ ) na integridade do DNA dos espermatozóides. Assim, apesar de concordarmos com Johannisson *et al.* (2009), quando afirma que esta técnica é útil na selecção espermática e na manutenção da qualidade espermática ao longo da refrigeração, colocamos algumas reservas quanto à sua aplicação generalizada na prática reprodutiva clínica. A aplicação de Androcoll-E não é economicamente justificável, no caso de sémen de garanhão que mantenha até às 48 horas de refrigeração uma motilidade aceitável (entre 50-30%) e com um número de espermatozóides móveis superior a 500 milhões, a não ser se resultar num aumento de fertilidade, ainda não comprovado. No caso de garanhões com sémen sensível à refrigeração, a aplicação do Androcoll-E é indicada, apenas quando este protocolo beneficia a motilidade progressiva ao longo de 48 horas. De acordo com a nossa experiência na aplicação deste tratamento (investigação e aplicação clínica), apesar de nem todos os ejaculados sensíveis à refrigeração melhorarem a sua resistência à refrigeração com a aplicação do Androcoll-E, observamos bons resultados num garanhão com sémen altamente sensível à refrigeração (em 24 horas a motilidade progressiva descia de 45% para <10%), que após tratamento mantinha uma motilidade progressiva superior a 30% até 72 horas após a colheita. Assim, consideramos que execução do protocolo de selecção

espermática (Androcoll-E) só se justificará quando se observem efeitos positivos muito evidentes nos parâmetros espermáticos de sémen fresco e refrigerado, de ganhanhos sensíveis à refrigeração.

Em relação ao sémen criopreservado, Hoogewijs *et al.* (2011), utilizando 8 ganhanhos, observaram melhorias dos parâmetros cinéticos das células espermáticas após a descongelação, quando o Androcoll-E foi aplicado pré-criopreservação. Uma experiência preliminar por nós executada (Anexo I) utilizando 6 ejaculados de 6 ganhanhos não demonstrou nenhum benefício do tratamento referido na qualidade do sémen congelado/descongelado. Na experiência mais alargada e que faz parte desta tese (Capítulo 2), onde utilizamos 20 ganhanhos diferentes, também não conseguimos demonstrar alterações dos parâmetros cinéticos avaliados (TM, VAP, VSL e RAP) entre os grupos (excluindo o STR). Apesar da nossa amostragem ser mais do dobro da de Hoogewijs *et al.* (2011), não podemos afirmar taxativamente que a aplicação pré-criopreservação de Androcoll-E não melhora a qualidade espermática pós-descongelação, pois provavelmente existem várias diferenças significativas entre os 2 desenhos experimentais, nomeadamente a genética (raças distintas) dos cavalos utilizados. No decorrer das nossas experiências verificamos que no caso de dois ganhanhos a motilidade pós-descongelação do sémen no grupo SLC era idêntica ou melhor que a do sémen fresco (neste caso ambos os ganhanhos já produziam sémen considerados como “bons” congeladores). Mas tal não se verificou na população geral estudada. Em base aos factos só podemos afirmar que não encontramos benefícios significativos na utilização deste protocolo pré-criopreservação, mas estamos de acordo com Hoogewijs *et al.* (2011) quando afirmamos que a aplicação deste protocolo de selecção espermática antes da criopreservação pode ser útil no melhoramento dos parâmetros seminais pós descongelação de certos e determinados ejaculados de ganhanhos (ganhão-dependente).

O Capítulo 3 baseou-se em dados provenientes da prestação de serviços do CRAV, em que avaliamos retrospectivamente dois itens: os índices de fertilidade e de patologia uterina em éguas sujeitas a IA ou a monta natural com um ganhão portador *Pseudomonas aeruginosa*; e a taxa de recolha e qualidade dos embriões recolhidos aos 8 dias após ovulação de éguas reproduzidas por IA e monta natural com o mesmo ganhão. Esta experiência, não tendo sido baseada num desenho experimental pré-planeado, não foi possível obter uma

amostragem homogénea, o que impediu a extracção de conclusões sólidas. No entanto, os resultados são de considerável interesse, pelos indícios que apontam.

A capacidade de transmissão *Pseudomonas aeruginosa* venérea de garanhão para égua ficou confirmada (metade das éguas ficaram portadoras a *Ps. aeruginosa*). Apesar de nenhuma égua ter ficado portadora de *Ps. aeruginosa* após IA, não podemos afirmar que esse risco não existe. Apenas podemos sugerir, tal como Samper e Tibary (2006), que o risco de contaminação é menor, facto extremamente importante na prática clínica. Independentemente do número de observações ser reduzido e dos resultados não estarem estatisticamente validados, estes sugerem uma diminuição da taxa de prenhez por ciclo após monta natural (40%) comparado com a IA (64%). É de salientar que existiu um maior índice de patologia uterina associado à monta natural (54%) que após IA (22%). Apesar da amostra não se adequar a um tratamento estatístico, os resultados são suficientes para desaconselhar na prática clínica o uso de monta natural com garanhões portadores de *Ps. aeruginosa*, nomeadamente utilizando um argumento a que todos os proprietários de éguas estão receptivos: mesmo que potencialmente não haja diferenças de fertilidade, o custo económico por prenhez é bem maior com a monta natural, dados os tratamentos agressivos com lavagens e antibióticos intra uterinos aplicados após a monta natural. Adicionalmente, aumenta-se o risco de contaminação da égua com a monta natural.

A taxa de recolha de embrião foi igual com ambas as modalidades de serviço (66%), mas obtivemos blastocistos de menor qualidade quando se utilizou a monta natural (66.6% de embriões de grau I e II) do que quando se inseminaram as éguas (100% de embriões grau I). McCue *et al.* (2009) refere que de 623 embriões recolhidos 95.5% eram de boa a excelente qualidade (grau I e II), justificando esta elevada percentagem com a capacidade do oviducto da égua transportar apenas embriões viáveis. Apesar de não podermos estabelecer uma relação cabal entre contaminação e técnica reprodutiva, a transmissão venérea de *Ps. aeruginosa* ocorreu apenas por monta natural e esteve associada a um decréscimo da qualidade dos embriões recolhidos. Seria interessante a realização de estudos com maior amostragem para confirmar a possibilidade desta bactéria influenciar a qualidade dos embriões.

Por fim, no Capítulo 4 a nossa pesquisa incidiu na recolha e criopreservação dos espermatozóides da cauda do epidídimo. A recolha das reservas extra-gonadais para criopreservação tem ao longo destes 4 anos vindo a ser cada vez mais requisitada aos nossos serviços, pelo facto de ser a última oportunidade de conservar germoplasma de garanhões que morrem ou que são castrados de urgência. Para criopreservar os espermatozóides da cauda do epidídimo de um garanhão que morreu ou que foi sujeito a castração é necessário enviar os dois complexos testículo-epidídimo para um laboratório de reprodução assistida. Frequentemente o transporte demora até 24 horas, sendo necessário refrigerar o material biológico a 4°C. É economicamente menos oneroso e correm-se menos riscos sanitários enviando apenas um tubo com a suspensão de espermatozóides epididimários refrigerados, do que os volumosos complexos testículo-epidídimo refrigerados.

Para testar se o método de preservação dos espermatozóides num diluidor de sémen durante 24 h a 4°C, tinha efeitos deletérios sobre os parâmetros seminais pós descongelação, comparamo-lo com o método de refrigeração dos complexos testículo-epidídimo. Após descongelação, não se observaram diferenças ( $p>0.05$ ) entre os grupos experimentais relativamente aos parâmetros cinéticos (TM, VAP e RAP), de morfologia e de viabilidade dos espermatozóides. Assim, e pela primeira vez no garanhão, ficou demonstrado que a refrigeração durante 24 h dos espermatozóides epididimários num diluidor adequado, antes da criopreservação, é uma opção viável como alternativa ao transporte dos complexos testículo-epidídimo. Deste modo, o veterinário que realizar a castração poderá escolher o protocolo de refrigeração a utilizar consoante as condições disponíveis.

Ainda neste estudo, comparámos os parâmetros de cinética, morfologia e viabilidade dos espermatozóides obtidos por ejaculação com os espermatozóides epididimários, após criopreservação, tendo sido registado uma maior percentagem de espermatozóides viáveis no grupo epididimário criopreservado imediatamente após castração. Esta diferença, já descrita por outros autores, pode ser atribuída à maior resistência ao choque térmico dos espermatozóides epididimários, por ausência de contacto com o plasma seminal (Monteiro *et al.*, 2011). Adicionalmente, neste estudo, e ao contrário do registado por Magistrini *et al.* (1988) não foi observada ( $p>0.05$ ) uma correlação significativa entre a

motilidade progressiva do sémen colhido com VA e os espermatozóides da cauda do epidídimo. Este facto é importante, pois de acordo com os nossos dados a motilidade pós-descongelção de sémen ejaculado não deverá ser indicativa da motilidade pós-descongelção de espermatozóides provenientes da cauda do epidídimo.

A capacidade fertilizante do sémen criopreservado da cauda do epidídimo está comprovada desde 1957 por Barker e Gandier (1957), na qual obtiveram uma prenhez após oito IA's com espermatozoides da cauda do epidídimo diluídos em leite e conservados a -79°C em gelo seco. Havia dúvidas em relação às taxas de fertilidade utilizando espermatozóides epididimários criopreservados, pois Morris *et al.* (2001) obteve uns decepcionantes 17% de taxa de prenhez por IA (14 IA's) após inseminação histeroscópica com 100 milhões de espermatozóides totais criopreservados com um protocolo distinto. Recentemente, Monteiro *et al.* (2011) realizaram testes de fertilidade inseminando (IA profunda) 800 milhões de espermatozóides epididimários viáveis pós-descongelção (com o mesmo protocolo de criopreservação utilizado neste estudo), tendo obtido 62.3% e 92.3% de taxa de prenhez por IA, respectivamente com espermatozóides epididimários criopreservados às 0 e 24 h após castração.

Apesar de não termos executado testes de fertilidade, cremos ter sido os pioneiros a publicar resultados de uma gestação após transferência de embrião obtido após IA com sémen epididimário criopreservado (Anexo IV). Uma única IA e lavagem uterina executada numa égua dadora jovem (5 anos) resultaram na recolha de um blastocisto (grau II) que transferido para uma receptora resultou numa prenhez. A projecção de data de parto é para Julho de 2014. De referir que os resultados positivos de congelação de espermatozóides do epidídimo (Capítulo 4) e a confirmação de várias gestações após IA feitas por clínicos veterinários (dados não publicados), levou ao aumento da procura desta técnica por parte de proprietários de gananhões.

As normas para circulação internacional de sémen criopreservado exigem, por grande parte dos países importadores, a testagem repetida dos gananhões para isolamento de bactérias específicas passíveis de induzir enfermidades venéreas. Obviamente esta repetição de testagem não é exequível em gananhões que sofreram morte súbita e criopreservaram as reservas espermáticas extra-gonadais. É do senso comum considerar que a carga contaminante presente no

sémen de garanhões saudáveis ocorre durante a ejaculação e é oriunda da uretra distal e fossa uretral. No entanto, para definir padrões sanitários de circulação internacional de sémen epididimário é necessária confirmação científica de ausência de bactérias nos epidídimos. Nesse sentido, pesquisamos (Anexo III) a presença de microorganismos na cauda do epidídimo de 11 garanhões clinicamente saudáveis, e confirmamos a ausência de crescimento microbiológico.

Dentro das técnicas de reprodução assistida, alguns estudos foram interrompidos e outros estudos por fazer devido a alguns constrangimentos ocorridos. A destruição parcial do laboratório, em consequência de um tornado (Outubro de 2011) e o assalto ao laboratório do CRAV (Abril de 2013), com o furto do equipamento, provocaram não só atrasos temporais na investigação, mas também as perdas de importante informação compilada.

No futuro temos por objectivo dar seguimento às várias linhas de investigação desenvolvidas no decorrer deste trabalho.

Constatando as grandes diferenças, entre estudos, na frequência de isolamento de leveduras, pretendemos executar um estudo (com amostragem alargada) onde queremos determinar quais as espécies fúngicas (recorrendo à genotipagem) presentes na genitália externa e sémen do garanhão e no clitóris e útero de éguas saudáveis e de éguas com endometrite clínica, após aplicação de técnica de reprodução assistida, tentando elucidar a patogénese dos fungos e o seu impacto sobre a fertilidade.

Desejamos também elucidar a patogénese dos géneros *Staph. aureus*, *K. pneumoniae*, *Strep. zooepidemicus* e *Ps. aeruginosa*, determinando se estes estão presentes no ambiente, veterinário (mãos), garanhão (genitália externa e sémen) e égua (clitóris e útero), e se possuem os mesmos genótipos, contribuindo eventualmente determinar quais são realmente os microorganismos comensais da genitália do garanhão ou da égua, e quais são os oriundos do ambiente ou das mãos dos operadores veterinários.

Iremos também, aprofundar os estudos sobre a eficácia do Androcoll-E para remover bactérias potencialmente patogénicas (*E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Strep. zooepidemicus* e *Staph. aureus*) de ejaculados portadores das mesmas, e confirmar a capacidade de remover a *Taylorella equigenitalis* adicionada a ejaculados frescos, e verificar o impacto das melhorias de parâmetros cinéticos de sémen refrigerado na fertilidade das éguas inseminadas.

A capacidade de transmissão de doenças venéreas através da transferência de embriões contaminados é uma hipótese. Por isso, pretendemos pesquisar se embriões recolhidos de éguas dadoras positivas à *Ps. aeruginosa*, possuem capacidade de transmissão de *Ps. aeruginosa* para a égua receptora e se afecta a taxa de sucesso da TE.



## Referências Bibliográficas

- Allen WR. 2005. The development and application of the modern reproductive technologies to horse. Breeding. *Reproduction in domestic Animals*, **40**: 310-329.
- Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL. 2005. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Animal Reproduction Science*, **89**: 105–113.
- Aurich C, Spergser J. 2007. Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. *Theriogenology*, **67**: 912-918.
- Barker CAV, Gandier JCC. 1957. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, **XXI** (2): 47-51.
- Bristol F. 1991. Bacterial flora of the reproductive tract in stallions. *Society Theriogenology Annual Meeting*, San Diego, pp: 171–173.
- Cerny KL, Little CF, Scoggin RJ, Coleman MHT, Troedsson EL, 2012: Presence of bacteria in the reproductive tract of healthy stallions and its relation to the fertility of mares. *Proceedings of the Society for Theriogenology Annual Conference*, pp: 427.
- Colenbrander B, Gadella BM, Stout TA. 2003. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, **38**: 305-311.
- Corona A, Cherchi R. 2009. Microbial quality of equine frozen semen. *Animal Reproduction Science*, **115**: 103–109.
- Costa AL, Martins-Bessa A, Rebello de Andrade A, Guimarães T, Rebordão MR, Gambôa S, Pinto Bravo P, Correia MJ, Colaço J, Gaivão I, Rocha A. 2012. Single Layer Centrifugation with Androcoll-E™ improved progressive motility and percentage of live spermatozoa with intact acrosome of chilled stallion semen but did not have an effect on DNA integrity. *Open Journal of Animal Sciences*, **2** (3): 159-165
- Coutinho da Silva MA, Alvarenga MA. 2011: Fungal Endometritis. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD (ed.), *Equine Reproduction*, 2<sup>nd</sup> edition. Wiley-Blackwell, pp: 2643-2651.

- Davis HA, Stanton MB, Thungrat K, Boothe DM, 2013: Uterine bacterial isolates from mares and their resistance to antimicrobials: 8,296 cases (2003–2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **242**: 977-83.
- El-Bahrawy KA, El Sayed E, El-Hassanein, Kamel YA. 2010. Comparison of gentamicin and ciprofloxacin in dromedary camels semen extender. *World Journal of Agricultural Sciences*, **6** (suppl 4): 419-424.
- Erol E, Locke S, Donahoe J, Mackin M, Carter C, 2012: Beta-hemolytic *Streptococcus* spp. From horses: a retrospective study (2000-2010). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **24**: 142-147.
- Frontoso R, De Carlo E, Pasolini MP, Van der Meulen K, Pagnini U, Iovane G, De Martino L, 2008 : Retrospective study of bacterial isolates and their microbial susceptibilities in equine uteri during fertility problems. *Veterinary Science*, **84**: 1-6.
- Hinrichs K, Cummings M, Sertich P, Kenney R. 1988. Clinical significance of aerobic bacterial flora of uterus, vagina, vestibule, and clitoral fossa of clinically normal mares. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **193**: 72-75.
- Hoogewijs M, Morrell J, Van Soom A, Govaere J, Johannisson A, Piepers S, De Schauwer C, De Kruif A, De Vliegher S. 2011. Sperm selection using single layer centrifugation prior to cryopreservation can increase thawed sperm quality in stallions. *Equine Veterinary Journal*, **43**: 35-41.
- Hughes J, Loy R. 1975. The relation of infection to infertility in the mare and stallion. *Equine Veterinary Journal*, **7**(3): 155-159.
- Johannisson A, Morrell JM, Thorén J, Jönsson M, Dalin A-M, Rodriguez-Martinez H. 2009. Colloidal centrifugation with Androcoll-E™ prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Animal Reproduction Science*, **116**: 119-128.
- Kenney RM, Bergman RV, Cooper WL, Morse GW. 1975. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners*, pp: 327-336.

- Kuisma P, Andersson M, Koskinen E, Katila T. 2006. Fertility of frozen thawed stallion semen cannot be predicted by the current used laboratory methods. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **48**: 14-21.
- LeBlanc MM, Causey RC. 2009. Clinical and Subclinical Endometritis in the Mare: Both Threats to Fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, **44** (suppl 3): 10-22.
- Loomis PR, Graham JK. 2008. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*, **105**: 119-128.
- Lu KG, Morressey PR. 2006. Reproductive tract infections in horses. *Veterinary Clinics of North America*, **22**: 519-552.
- Madsen M and Christensen P. 1995. Bacterial flora of semen collected from Danish Warmblood stallions by artificial vagina. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **36**: 1-7.
- Magistrini M, Tinel C, Noue P, Palmer E. 1988. Correlations between characteristics of frozen spermatozoa from ejaculates or perfusates from cauda epididymis and proximal deferent duct in a group of stallions. *Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, pp. 273.
- Malmgren L, Engvall EO, Engvall A, Albiñ A. 1998. Aerobic bacterial flora of semen and stallion reproductive tract and its relation to fertility under field conditions. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **39**: 173-182.
- McCue PM, DeLuca CA, Ferris RA, Wall JJ. 2009. How to evaluate equine embryos. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*, Las Vegas, **55**: 252-255.
- Monteiro GA, Papa FO, Zahn FS, Dellaqua JA, Melo CM, Maziero RRD, Avanzi BR, Alvarenga MA, Guasti PN, 2011. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, **127**: 197-201.
- Morrell M, Klein C, Lundeheim N, Erol E, Troedsson MHT. 2014. Removal of bacteria from stallion semen by colloid centrifugation. *Animal Reproduction Science*, (In Press).

- Morrell JM, Wallgren M. 2011. Removal of bacteria from boar ejaculates by Single Layer Centrifugation can reduce the use of antibiotics in semen extenders. *Animal Reproduction Science*, **123**: 64–69.
- Morris LHA, Tiplady C, Wilsher, S, Allen WR. 2000. Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of frozen–thawed ejaculated and epididymal spermatozoa. *Proceedings of 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Havemeyer Foundation Monograph Series*, **3**: 4–6.
- Najjar A, Ben Said S, Benaoun B, Ezzaouia M, Sattouri J, Ben Mrad M, Messadi L. 2010. *Journal of Reproduction and Infertility*, **1** (3): 62-65
- Ortega-Ferrusola C, González-Fernández L, Muriel A, Macías-García B, Rodríguez-Martínez H, Tapia JA, Alonso JM, Penã FJ. 2009. Does the Microbial Flora in the Ejaculate Affect the Freezeability of Stallion Sperm?. *Reproduction in Domestic Animals*, **44**: 518–522.
- Peterson A, Davis M, Awantang G, Limbago B, Fosheim G, Silbergeld EK. 2012. Correlation between animal nasal carriage and environmental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at U.S. horse and cattle farms. *Veterinary Microbiology*, **160**: 539-543.
- Rasmussen CD, Haugaard MM, Petersen MR, Nielsen JM, Pedersen HG, Bojesen AM, 2013: *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isolates from equine infectious endometritis belong to a distinct genetic group. *Veterinary Research*, **44**: 26-34.
- Rocha A, Guimarães T, Duarte JC, Cosinha C, Lopes VTA, Faria F, Amorim I, Gärtner F. 2012. Clinical, bacteriological and histopathological findings of a testicular fibrosis in a 6- years old Lusitano stallion. *Case Reports in Veterinary Medicine*, Article ID 989687, 5 pages.
- Rota A, Calicchio E, Nardoni S, Fratini F, Ebani VV, Sgorbini M, Panzani D, Camillo F, Mancianti F. 2011. Presence and distribution of fungi and bacteria in the reproductive tract of healthy stallions. *Theriogenology*, **76**: 464–470.
- Samper J, Tibary A, 2006: Disease transmission in horses. *Theriogenology*, **66**: 551-559.
- Sieme H, Harrison RAP, Petrunkina AM. 2008. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Animal Reproduction Science*, **107**: 276–292.

- Varner DD, Scanlan CM, Thompson JA, Brumbaugh GW, Blanchard TL, Carlton CM, Johnson L. 1998. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. *Theriogenology*, **50**: 559-573.
- Vidament M, Duperq AM, Julienne P, Evain A, Noue P, Palmer E. 1997. Equine frozen semen, freezability and fertility field results. *Theriogenology*, **48**: 907-917.
- Zubrod CJ, Farnsworth KD, Oaks JL, 2004: Evaluation of arthrocentesis site bacterial flora before and after 4 methods of preparation in horses with and without evidence of skin contamination. *Veterinary Surgery*, **33**: 525-530.

## **Anexos**

## **ANEXO I: Effect of Androcoll-E treatment on the frozen/thawed characteristics of equine semen.**

(Adaptado de: Guimarães T, Moreira A, Lopes G, Ferreira P, Rocha A. 2011. Effect of Androcoll-E treatment on the frozen/thawed characteristics of equine semen. V Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, Lisboa, pp: 52.)

### **Objective**

To test the effect of a single layer centrifugation treatment (Androcoll-E), on the freezability of stallion semen.

### **Metodology**

Six ejaculates from 6 stallions were collected by artificial vagina (AV). Immediately after collection ejaculates were evaluated with the Integrated Sperm Analysis System (ISAS®) for the following parameters: progressive motility (MP), total motility (MT), linear velocity (VSL), % of spermatozoa with high velocity (% HVSPZ), and average velocity (VAP). Subjective progressive motility (MPS) was assessed by optical microscopy. Ejaculates were split in two equal samples and the control sample (GC) was centrifuged for 10 min at 900 g and the Androcoll-E treated group (GT) was centrifuged for 20 min at 500 g. Afterwards the remaining pellets in both groups were diluted ( $200 \times 10^6$  SPZ/mL) in Botucurio® extender, and ten 0.5 mL straws were frozen for each treatment, accordingly to Alvarenga *et al.* (2005). After thawing (1 min at 37°C) the semen of one straw from each treatment was evaluated for the above described parameters. The Mann-Whitney test was used to compare parameters between the 2 treatments.

### **Results**

The mean±standard error of the evaluated parameters for fresh semen was: MPS-45±1.8%; MP-38.0±4.1%; MT-74.4±5.4%; VSL-23.9±2.7µm/s; VAP-41.4±4.4µm/s; % HVSPZ-21.6±4.6%. No differences ( $p>0,05$ ) were seen between the 2 experimental groups after thawing: GC (MPS-33.3±3.8%; MP-

20.4±8.8%; MT-43.7±5.3%; VSL-22.4±3.0 µm/s; VAP-33.5±3.3 µm/s; % HVSPZ-7.4±2.2%); GT (MPS-35.8±10.4%, MP-23.4±9.8%, MT-44.3±12.5%, VSL-26.0±5.0 µm/s, VAP-34.8±5.6 µm/s, % HVSPZ-6.8±3.3%).

## **Discussion**

These data failed to show an advantage of the Androcoll-E treatment in the frozen/thawed parameters of the 6 ejaculates. However, it should be noted that in 2 ejaculates (33.3% of the sample) the post-thawing parameters were better for the GT samples, in particular for MPS (GT 65% and 70% vs GC 35% and 40%) and for MP (GT 47.6% and 59.0% vs GC 21.3% and 33.8%). For these 2 ejaculates the MPS and MP percentages in the GT group were even higher than in the fresh semen (MPS 45% and 40%; MP 38.6% and 24.3%). It is suggested that Androcoll-E treatment can enhance freezability only in a stallion-dependent manner.

## **References**

Alvarenga MA *et al.* (2005). Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Animal Reproduction Science*, **89**:105-113.



## **ANEXO II: Effect of two different refrigeration processes on the quality of chilled and frozen/thawed epididymal spermatozoa.**

(Adaptado de: Guimarães T, Lopes G, Reis I, Ferreira P, Domingues J, Rocha A. 2012. Effect of two different refrigeration processes on the quality of chilled and frozen/thawed epididymal spermatozoa. *18<sup>th</sup> Annual Meeting of the Italian Association of Equine Veterinarians*, Bolonha, pp: 185-6.)

### **Introduction**

Cryopreservation of epididymal spermatozoa is a useful tool to preserve genetic material of valuable stallions after emergency castration or unexpected death. Often, testicles and epididymides are sent refrigerated to the laboratory. The collection of epididymal spermatozoa is a simple procedure (1) that reduces the volume of the material to be shipped, and may improve the quality of the chilled epididymal sperm cells. In the present study we compared the characteristics of chilled and frozen/thawed epididymal spermatozoa (SPZ), using refrigeration of the epididymides vs. direct refrigeration of the epididymal sperm cells.

### **Materials and used methods**

For that, epididymides of nine stallions subjected to routine castrations were utilized. After the orchiectomy, one testicle and corresponding epididymis were refrigerated at 5°C (EPI R) for 24 h. The epididymal cauda of the contralateral testicle was immediately separated and spermatozoa were flushed with 50 mL Kenney medium and refrigerated for 24 h at 5°C (ESPZ R). The same flushing method was applied to collect SPZ from the EPI R group, after the refrigeration period. Spermatozoa concentration was assessed with the Newbauer chamber immediately after flushing. After 24-h chilling, SPZ were frozen utilizing the Botucio® extender in 0.5 mL straws (2). Weight of testicles and tail of the epididymides were recorded. Viability (eosin-nigrosin staining) and sperm cell morphology (Diff-Quick, optical microscopy, 1000 x magnification) were evaluated after 24-h refrigeration and after

freezing/thawing. Progressive motility (optical microscopy) was assessed after the 24 hr refrigeration following centrifugation (10 min, 900g), after addition of Botucurio® extender (MPE)

and after thawing (MPT). Previously to motility assessment, SPZ were warmed to 37°C. Thawing was done immersing the straws for 1 minute in a water bath at 37°C. Total motility (TM), linear velocity (VSL), and percentage of rapid sperm of frozen/thawed SPZ (RAP%) was evaluated with a CASA system (ISAS®).

## **Results**

The weight of left ( $174.30 \pm 14.41$ ) and right testicles ( $176.90 \pm 11.84$ ) and left ( $13.86 \pm 0.89$ ) and right cauda epididymides ( $12.35 \pm 1.03$ ) did not differ ( $p > 0.05$ ). Total number of SPZ recovered was  $8878 \pm 1112 \times 10^6$  for EPI R and  $9014 \pm 1456 \times 10^6$  for ESPZ R ( $p > 0.05$ ). No difference ( $p > 0.05$ ) in percentage of viable cells or in abnormal sperm cells was found between EPI R and ESPZ R before and after cryopreservation. MPE and MPT ( $61.00 \pm 7.97$  vs  $50.00 \pm 10.41$ ;  $29.38 \pm 4.58$  vs  $24.29 \pm 5.05$ , for EPI R and ESPZ R, respectively) did not differ ( $p > 0.05$ ). After thawing no differences ( $p > 0.05$ ) were observed between experimental groups regarding TM, VSL and RAP% ( $42.95 \pm 5.29$  vs  $49.46 \pm 7.74$ ;  $16.63 \pm 1.83$  vs  $19.24 \pm 2.24$ ;  $4.25 \pm 9.93$  vs  $6.74 \pm 1.69$  for EPI R and ESPZ R, respectively).

## **Conclusions**

In conclusion, both methods of refrigeration were equally efficient for chilling and freezing epididymal SPZ. The method of choice to chill epididymal SPZ may be chosen based on operator preference and/or cost of shipping.

## **Acknowledgments.**

This research project was partially supported by project FCOMP-01-0124-FEDER-009562/FCT PTDC/CVT/108456/2008.

## **References**

Bruemmer JE (2006): Collection and freezing of epididymal stallion sperm. *Veterinary Clinic of North America Equine Practice*, **3**: 677-682.

Monteiro GA *et al.* (2011): Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, **127**: 197-201.

## **ANEXO III: Are there bacteria in the epididymis of healthy stallions?**

(Adaptado de: Guimarães T, Pinto M, Miranda C, Silva E, Thompson G, Lopes G, Fernandes G, Rocha A. 2013. Are there bacteria in the epididymis of healthy stallions? *13<sup>th</sup> International Congress of the World Equine Veterinary Association*, Budapeste)

### **Introduction**

Collection and preservation of spermatozoa from the epididymis allows for the utilization of fertile male gametes in case of sudden death or emergency castration of stallions. Bacteria in the semen can affect the outcome of artificial inseminations. Epididymal contents are considered to be sterile but no systematic attempts to isolate microorganisms from the epididymis have been done.

### **Objective**

To verify if microorganisms can be isolated from the epididymal tails of healthy stallions.

### **Methods**

Eleven stallions presented for elective orchiectomy were utilized. Samples of the distal urethra and urethral fossa were collected with a sterile swab. Excised testis/epididymis complexes were processed within 6 hours of castration. The testis/epididymis complexes were washed externally with a germicidal solution, the epididymal tails were isolated and dissected, and the lumen flushed with a sterile ringier lactate solution in sterile conditions. Samples of the collected epididymal sperm-rich solutions as well as swabs of the external genitalia were cultured onto Columbia agar supplemented with 5% sheep blood, MacConkey agar and Sabouraud glucose agar plates, and subsequently incubated under aerobic conditions at 37°C for 48 hrs. Morphological characterization of bacterial growth was followed by biochemical characterization and species identification using IMViC, triple sugar iron agar,

nitrate reduction, urease, catalase and coagulase tests and/or with the API identification system.

## Results

Microorganisms were isolated from all urethral samples: *Staphylococcus* spp. coagulase negative (3/11), *Streptococcus*  $\alpha$ -haemolytic (1/11), *Acinetobacter* spp. (2/11), *Bacillus* spp. (1/11), *S. equisimilis* (1/11), *E. coli* (1/11), and yeasts (11/11). No microorganisms were isolated from epididymal samples.

## Discussion

As expected, the epididymal contents of these healthy stallions seem to be sterile.

## Conclusion

The sperm cells collected from the epididymal tail of healthy stallions are sanitarily safe to be used for artificial insemination in respect to bacteria and yeasts contamination.

## **ANEXO IV: First report of a pregnancy in a mare after the transfer of an embryo produced by artificial insemination with epididymal sperm.**

(Adaptado de: Guimarães T, Cunha R, Lopes J, Rocha A. 2014. First report of a pregnancy in a mare after the transfer of an embryo produced by artificial insemination with epididymal sperm. VI Congresso de Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, Lisboa.)

### **Introduction**

Cryopreservation of epididymal sperm cells (SPZ) is a useful tool to preserve genetic material of stallions after emergency castration or unexpected death (1). Conception rates obtained after artificial insemination (AI) with epididymal frozen-thawed SPZ or with ejaculated sperm did not differ (2). To our knowledge no reports on the use of epididymal sperm in embryo transfer (ET) programs have been published. Predictably, this technique will be used for the most valuable stallions, often used to inseminate mares of high genetic merit, which in turn are the ones most likely to be chosen as embryo donors.

### **Objective**

This report describes for the first time a pregnancy of a mare after being implanted with an embryo produced by AI with epididymal SPZ.

### **Metodology and Results**

A 22 years old donor mare was inseminated with froze-thawed epididymal SPZ ( $\geq 500 \times 10^6$  motile SPZ/AI) in 4 different estruses, using semen of 2 different stallion (2 AI/stallion). No embryo was obtained after uterine flushing. A history of poor uterine histology and chronic metrites with isolation of *Escherichia coli* may have contributed to the negative results.

In order to assess the results using a young fertile female, a 5 years old uniparous mare, without any clinical sign of uterine pathology and with a uterine biopsy classified as IIA was inseminated once with froze-thawed epididymal semen. A insemination dose of  $\geq 500 \times 10^6$  motile SPZ was constituted mixing up the semen of 5 stallions used for research, to avoid the utilization of valuable

epididymal semen commercially cryopreserved from the 2 previously utilized stallions. A transcervical uterine flushing was performed 9 days post ovulation to retrieve the embryo.

A Grade 2 blastocyst was recovered and immediately transferred transcervically to a mare (day 9 of diestrus). An embryonic vesicle was detected by transrectal ultrasonographic imaging three days after the transfer of the embryo. Regular ultrasonographic examinations confirmed fetal heart beat and supplementary corpora lutea. The mare kept the pregnancy until this day (110 days of gestation).

## **Discussion**

The efficiency of epididymal sperm for ET programs as compared to ejaculated semen can only be assessed after experiments using large number of animals, with stallions with diverse semen quality and donor mares of various ages. Nevertheless this result confirms for the first time that epididymal sperm can be used successfully in ET programs.

## **Acknowledgments**

This research project was partially supported by project FCOMP-01-0124-FEDER-009562/FCT PTDC/CVT/108456/2008.

## **References**

- Monteiro GA *et al.* (2011): Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, **127**:197-201.
- Guimarães T *et al.* (2012): Characteristics of stallion epididymal spermatozoa at collection and effect of two refrigeration protocols on the quality of the frozen/thawed sperm cells. *Animal Reproduction Science*, **136**:85-9.